

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Zoología y Fisiología Animal



TESIS DOCTORAL

**Efectos fisiológicos de la adaptación a la temperatura en el
desarrollo de anfibios : influencia del frío en la actividad
lactato-deshidrogenasa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jorge de Costa Ruiz

DIRECTOR:

Mercedes Alonso Bedate

Madrid, 2015

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA ADAPTACIÓN A LA
TEMPERATURA EN EL DESARROLLO DE ANFIBIOS.
INFLUENCIA DEL FIRIO EN LA ACTIVIDAD
LACTATO DESHIDROGENASA.

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas presenta
JORGE DE COSTA RUIZ.



MADRID, MAYO DE 1978.

R 23.199



Este trabajo de investigación se ha realizado en la Cátedra de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Profesora Da. Mercedes Alonso Bedate. A ella y al Catedrático Titular de dicha Cátedra, D. Arsenio Fraile Ovejero, deseo expresar mi enorme gratitud por su constante apoyo, orientación e interés.

También quisiera agradecer al Profesor D. Ignacio Nuñez de Castro las iniciativas brindadas, así como a Juan Alberto Sigüenza, Rosa Bueno, Begoña Peris y Gustavo Barja de Quiroga, y, en general, a todos los compañeros de la Cátedra y de fuera de ella, por su colaboración y amistad. Gracias también a Pilar Mendiola por todo esto y mucho más.

INDICE

-INTRODUCCION.....	1
-I.-CAPACIDAD DE ADAPTACION A LA TEMPERATURA DE LOS POIQUILOTERMOS.....	3
-1.-Adaptación global de los animales.....	4
-A.-Compensación térmica instantanea.....	4
-B.-Compensación térmica por aclimatación.....	5
-C.-Compensación térmica evolutiva.....	8
-2.-Órganos y tejidos.....	10
-A.-Compensación térmica instantanea.....	10
-B.-Compensación térmica por aclimatación.....	10
-C.-Compensación térmica evolutiva.....	17
-3.-Metabolismo celular y cambios estructurales.....	18
-A.-Compensación térmica instantanea.....	18
-B.-Compensación térmica por aclimatación.....	18
-C.-Compensación térmica evolutiva.....	23
-4.-Actividades enzimáticas.....	24
-A.-Compensación térmica instantanea.....	24
-B.-Compensación térmica por aclimatación.....	24
-C.-Compensación térmica evolutiva.....	28
-II.-MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACION A LA TEMPERATURA EN LOS POIQUILOTERMOS.....	29
-1.-Iniciación de la respuesta de aclimatación.....	29
-2.-Mecanismos implicados en la com- pensación de las actividades enzimáticas.....	31
-A.-Compensación térmica instantanea.....	31
-B.-Compensación térmica por aclimatación.....	34
-C.-Compensación térmica evolutiva.....	40

-III.-LACTATO DESHIDROGENASA.....	42
-1.-Multiplicidad de la LDH.....	43
-A.-Bases moleculares de la multiplicidad.....	43
-B.-Multiplicidad genética de la LDH.....	44
-C.-La multiplicidad de la LDH y el fenómeno epigenético.....	46
-2.-Propiedades generales de las isoenzimas de LDH.....	47
-A.-Estructura y composición de aminoácidos.....	48
-B.-Propiedades cinéticas.....	50
-C.-Distribución tisular y función fisiológica.....	51
-3.-Filogenia y evolución de la LDH.....	57
-A.-Relaciones filogenéticas de las isoenzimas de LDH.....	57
-B.-Evolución de los genes de la LDH..	59
-4.-Isoenzimas de LDH y ontogenia.....	61
-A.-Perfil histórico.....	61
-B.-Actividades de la LDH durante la organogénesis.....	63
-C.-Actividad LDH en los estados iniciales del desarrollo.....	65
-5.-Degradación de la LDH.....	66
-A.-Renovación de las isoenzimas.....	67
-B.-Degradación y ontogenia.....	69
-6.-Hormonas e isoenzimas de LDH.....	69
-7.-Microlocalización de las isoenzimas de LDH.....	70
-A.-LDH ₁	71
-B.-LDH ₅	71
-8.-Cambios en las isoenzimas de LDH re- lacionados con procesos patológicos...	72
-A.-Cambios en los tejidos.....	72
-B.-Cambios en el suero.....	73
-9.-Variaciones de la LDH debidas a cam-	

bios en la temperatura ambiente.....	74
-A.-Homeotermos.....	74
-B.-Poiquilotermos.....	76
-OBJETIVOS.....	81
 -MATERIALES Y METODOS.....	83
-I.-MATERIALES.....	84
-1.-Productos.....	84
-2.-Aparatos.....	84
-3.-Animales de experimentación.....	85
-A.-Animales adultos.....	85
-B.-Estado 33 del desarrollo.....	88
-II.-METODOS DE OBSERVACION.....	92
-1.-Frecuencia cardiaca.....	92
-A.-Animales adultos.....	93
-B.-Estado 33 del desarrollo.....	93
-2.-Consumo de oxígeno en el estado	
33 del desarrollo.....	93
-3.-Medidas de las actividades LDH.....	95
-A.-Animales adultos.....	95
-B.-Estado 33 del desarrollo.....	105
-III.-METODOS ESTADISTICOS.....	106
-A.-Características muestrales.....	106
-B.-Prueba "t" de Student.....	107
-C.-Ajuste de una recta de regresión	
por mínimos cuadrados.....	108
 -RESULTADOS.....	109
-I.-FRECUENCIA CARDIACA EN LA ADAPTACION AL	
FRIO.....	110
-1.-Animales adultos.....	110
-2.-Estado 33 del desarrollo.....	110
-II.-CONSUMO DE OXIGENO EN EL ESTADO	
33 DEL DESARROLLO.....	110
-III.-DIMENSIONES CORPORALES.....	116
-1.-Pesos de los animales adultos en la	
adaptación experimental al frío, a-	
yuno y fotoperiodo mínimo.....	116

-2.-Tamaños en el estado 33 del	
desarrollo.....	117
-A.-Adaptación al frío.....	117
-B.-Adaptación al calor.....	117
-IV.-ACTIVIDADES DE LA LDH.....	119
-1.-Animales adultos.....	119
-A.-Adaptación experimental al frío,	
ayuno y fotoperíodo.....	119
-B.-Influencia de la estación.....	133
-C.-Km de las isoenzimas para	
el lactato.....	142
-2.-Estado 33 del desarrollo.....	150
-A.-Adaptación al frío.....	150
-B.-Adaptación al calor.....	166
-V.-RESUMEN GENERAL DE LOS RESULTADOS.....	169
-DISCUSION.....	178
-CONCLUSIONES.....	209
-BIBLIOGRAFIA.....	212

INTRODUCCION

Las actividades fisiológicas de los organismos están sujetas a la influencia de los factores físicos del medio ambiente, siendo los más importantes a este respecto la temperatura, los gases disueltos, la presión, la luz y la salinidad. Los conformistas fisiológicos, como es el caso de muchos invertebrados y, en algunos aspectos, los vertebrados inferiores, dependen más de los cambios de su ambiente físico que los reguladores fisiológicos, las aves y los mamíferos. Así, mientras que en los reguladores es notoria su capacidad de mantener un estado interno más o menos constante frente a las variaciones de las condiciones ambientales, muchos conformistas han desarrollado adaptaciones que les permiten explotar o, al menos, resistir las fluctuaciones de su medio (Hochachka y Somero, 1973).

La temperatura limita la distribución de los animales y, al mismo tiempo, determina su actividad en muchos casos. Las temperaturas de la superficie de los océanos abiertos están dentro de un intervalo entre -2 y 30°C , y las temperaturas del aire entre -70 y 85°C . En general, la actividad vital se da solo entre los 0°C y los 40°C , viviendo la mayoría de los animales entre unos límites no muy estrechos. Muchos animales tienen una temperatura corporal paralela, en cierto modo, a la del medio ambiente, estos son los animales de sangre fría o poiquiloterms; la palabra poiquilotérmico significa cambiante de temperatura (Prosser, 1973).

La temperatura de las células metabolizadoras es, necesariamente, más alta que la de su medio, debido a que la oxidación y la glucólisis liberan calor. La temperatura de un animal depende del balance de aquellos factores que tiendan a añadir o a substraer

calor. El calor se puede ganar por termogénesis metabólica (endotermia) o por absorción de calor de origen externo, principalmente de la radiación solar (ectotermia). El calor se pierde por radiación, convección, conducción y vaporización del agua; la pérdida de calor se favorece por los fluidos circulantes desde el interior del cuerpo a la superficie del mismo, y se reduce por el aislamiento. Los poiquiloterms no carecen por completo de control térmico, pueden realizar este tipo de control a través de mecanismos de comportamiento, por entrar en un estado de letargo (hibernación, brumación o torpor), o por compensaciones metabólicas o nerviosas (Prosser, 1973).

-I.-CAPACIDAD DE ADAPTACION A LA TEMPERATURA DE LOS POIQUILOTERMOS.-

Los poiquiloterms muestran alteraciones en las tasas de comportamiento, de algunas de sus funciones y de su actividad bioquímica, junto con cambios en las temperaturas letales, frente a las variaciones de la temperatura ambiental. Los poiquiloterms acuáticos son, además, incapaces de regular efectivamente su temperatura corporal mediante respuestas de comportamiento o metabólicas y circulatorias; la temperatura corporal de muchos de estos poiquiloterms refleja la del medio externo (temperatura del agua), excepto cuando esta última cambia muy rápidamente (Hazel y Prosser, 1974). En el caso de los anfibios terrestres y semiterrestres esta situación se complica, puesto que algunos absorben las radiaciones solares por exposición directa al sol, elevando sus temperaturas corporales muy por encima de las ambientales, mientras que otros, frente al exceso de calor o en la actividad normal, pueden enfriarse mediante la evaporación del agua corporal, manteniendo temperaturas internas por debajo de las ambientales (Brattstrom, 1970).

De todas formas, cuando un poiquiloterio se transfiere de un ambiente térmico a otro, muchos aspectos de su fisiología y de su bioquímica se alteran de manera que, a veces, compensan el cambio en la temperatura. Según Somero (Hochachka y Somero, 1973; Somero, 1969; Somero y Hochachka, 1969), las compensaciones térmicas pueden ocurrir en, por lo menos, tres tipos de periodos: 1) instantánea, 2) aclimatación - (o aclimatización) compensadora, al cabo de días o semanas de exposición a la nueva temperatura, y 3) - selección sobre varias generaciones de ciertas especies animales de variantes genéticos adaptados a un régimen particular de temperaturas. La selección natural, por otro lado, puede operar limitando las propiedades de respuesta instantánea y las de aclimatación compensadora.

-1.-Adaptación global de los animales.-

-A.-Compensación térmica instantánea.-

Los procesos fisiológicos que se caracterizan por mostrar valores de Q_{10} próximos a la unidad o substancialmente menores que los valores normales de Q_{10} (2-3) y no son irreversiblemente termolábiles, muestran, la mayoría de ellos, compensación térmica instantánea. Así, muchos poiquiloterios sometidos a fluctuaciones de su ambiente térmico muestran, a menudo, este tipo de compensación frente a ligeros cambios en la temperatura, al menos en una porción del intervalo de temperaturas propias de su ambiente natural. Se podrían citar los casos de la culebra Thamnophis sirtalis (Aleksiuk, 1971), las salamandras Desmognathus fuscus y D. ochropheaus (Fitzpatrick et al., - 1971, 1972) y la rana grillo Acris crepitans (Dunlap, 1971, 1972). Estos datos indican que muchos poiquiloterios presentan un intervalo térmico en el que su metabolismo de reposo es independiente de la temperatura y, en este sentido, estos organismos demuestran una capacidad para la compensación térmica instantánea.

nea.

-B.-Compensación térmica por aclimatación.-

Cuando un poiquiloterma se somete a un cambio de la temperatura ambiental persistente durante un periodo que oscile entre días y meses, se inician unos cambios adaptativos que pueden proporcionar al organismo tasas de actividad fisiológica similares a pesar de la temperatura corporal distinta. Este tipo de compensación ocurre en el periodo de vida de un individuo de una especie determinada y, generalmente, requiere varias semanas para que sea completo. A este proceso se le denomina normalmente aclimatización si el organismo responde a fluctuaciones estacionales de los parámetros ambientales de su ecosistema natural, o aclimatación si el organismo está respondiendo a un parámetro único y bien definido del medio ambiente - de ciertas condiciones experimentales (Hazel y Prosser, 1974).

-a.-Efectos de la aclimatación sobre la actividad global de los poiquiloterms.-

Cuando la temperatura baja o sube bruscamente, la mayoría de los poiquiloterms muestran una reacción exagerada (o sobrerrespuesta) o de conmoción, - la cual se pierde en minutos o en segundos. A continuación se produce un periodo de estabilización que puede durar horas; esta es la etapa que se utiliza normalmente para las determinaciones de la Q_{10} . La tasa estabilizada depende del estado de aclimatación y si el animal se devuelve a su temperatura original durante este período, la tasa vuelve a su valor inicial.

Una manifestación obvia de la compensación fisiológica de la temperatura es aquella en la que los poiquiloterms aclimatados exhiben, a menudo, niveles similares de actividad espontánea en ambientes

térmicos distintos. Como resultado de la aclimatación, los poiquiloterms acuáticos funcionan generalmente mejor en la temperatura a la que han sido aclimatados (Fry, 1967); así, el pez sol verde muestra una correlación positiva entre la temperatura de aclimatación y la velocidad máxima de natación (Roots y Prosser, 1962).

-i.-Consumo de oxígeno.-

Cuando un poiquiloterms es llevado brúscamente de un ambiente caliente a otro frío, el consumo de oxígeno cae inmediatamente debido a un efecto cinético directo de la temperatura en las reacciones implicadas; después de la fase estabilizada, el consumo de oxígeno crece a medida que el animal se va aclimatando y se estabiliza en un valor característico del estado de aclimatación al frío. La capacidad de adaptación ha sido clasificada por Precht (1958, 1973) de acuerdo con cinco tipos: 1) sobrecompensación; 2) compensación perfecta, la tasa aclimatada es la misma cuando se mide a la temperatura de aclimatación; 3) compensación parcial; 4) sin compensación, las tasas siguen la relación Q_{10} ; y 5) compensación inversa o paradójica, la tasa aclimatada al frío es menor que la de la transferencia directa de calor al frío.

Se conocen muchos ejemplos de aclimatación de tipo 2 y 3 del metabolismo total como medida del consumo de oxígeno de todo el animal; uno de ellos es el del lagarto Uta mearnsi (Murrish y Vance, 1968). También existen varios ejemplos sobre compensación de tipo 5 o inversa en el metabolismo de todo el animal, especialmente como consecuencia de la aclimatación al frío; algunos de ellos son: el de la rana hílida Pseudacris triseriata (Packard, 1972), las salamandras Desmognathus fuscus y D. ochrophaeus (Fitzpatrick et al., 1971, 1972), la rana grillo Acris cre-

pitans (Dunlap, 1971, 1972) y la rana carpintera Rana vergatipes (Holzman y McManus, 1973). Posiblemente, los animales que se vuelven letárgicos en temperaturas ambientales bajas puedan beneficiarse de la compensación inversa, de forma que, durante la exposición al frío, una reducción en la demanda y producción de energía resultante del modelo de compensación inversa podría aumentar el tiempo durante el que una reserva metabólica limitada mantendría al organismo (Hazel y Prosser, 1970; Hochachka, 1965). Sin embargo, otras especies de anfibios anuros que sufren hibernación en los meses fríos, como Rana temporaria, han mostrado compensación parcial en el consumo de oxígeno, aunque solo en los animales de invierno (Harri y Hedenstam, 1972; Harri, 1973, 1974b), la cual se aprecia a los 2 días de aclimatación; en Bufo woodhousei de verano, se ha detectado también compensación parcial en la aclimatación a 10, 15 y 20°C y sobrecompensación a los 25°C, de forma que, en el primer caso, se sugiere que la compensación metabólica parcial unida a la termorregulación por comportamiento, capacita a este animal para mantener un metabolismo energético relativamente independiente de los cambios diarios y estacionales de la temperatura ambiente durante su periodo de actividad, mientras que la sobrecompensación podría ser una adaptación para la conservación de energía durante los meses más calientes del verano (Fitzpatrick y Atebara, 1974).

En muchos casos, el intervalo de temperaturas del ambiente en el que se produce una meseta en el consumo de oxígeno en la que hay compensación instantánea, depende del historial térmico del organismo, variando este intervalo con la estación y la temperatura de aclimatación, de forma que el metabolismo es virtualmente independiente de la temperatura en las zonas correspondientes a la temperatura ambiental predominante (Hazel y Prosser, 1974). Se han descrito -

correlaciones entre las temperaturas de aclimatación y las regiones de Q_{10} baja para el metabolismo de la rana grillo (Dunlap, 1971), en salamandras (Fitzpatrick et al., 1971, 1972) y en Triturus alpestris y Salamandra atra (Knapp, 1974).

-ii.-Función endocrina.-

No se ha establecido correlación entre la temperatura de aclimatación y la actividad tiroidea y adrenal en peces, como por ejemplo, el ciprino (Klicka, 1965). En anfibios, concretamente en Rana pipiens, se ha encontrado que el hígado de animales aclimatados a 25°C, presentan un aumento del 21% al inyectar tiroxina a estos animales, mientras que las ranas aclimatadas a 15°C no tienen este efecto (Packard y Packard, 1975). Otras experiencias parecen dar a la tiroides y las adrenales un papel mediador en los cambios compensadores del metabolismo oxidativo durante la aclimatación a la temperatura en anfibios anuros, o, al menos, en el género Rana (Lagerspetz et al., 1974; Harri, 1973, 1974b), sugiriendo que las catecolaminas pueden tener un papel en la producción química de calor y que la adrenalina es la hormona mediadora (Harri y Hedenstam, 1972).

-C.-Compensación térmica evolutiva.-

La adaptación térmica durante periodos evolutivos es el proceso mediante el cual una especie se adapta a un ambiente térmico específico a lo largo de varias generaciones, con el resultado final de que organismos de latitudes muy diferentes pueden exhibir tasas similares de actividad fisiológica cuando se miden y se comparan en sus temperaturas ambientales (Hazel y Prosser, 1974). Dentro de este apartado se puede incluir también la aparición de cierto grado de termorregulación en algunas especies de poiquilotermos.

-a.-Metabolismo y consumo de oxígeno.-

Las curvas de metabolismo-temperatura de animales de regiones frías están más desplazadas hacia las temperaturas bajas que las correspondientes a los animales de las regiones cálidas. Cuando las curvas de los peces tropicales se extrapolan por debajo de sus temperaturas letales inferiores, quedan más abajo que las de las especies árticas (Scholander et al., 1953). Algo similar parece ocurrir en los anfibios - (Brattstrom, 1970), cabiendo la posibilidad de que el metabolismo anaerobio tenga un papel inesperado. Por otro lado, se ha observado que los organismos sujetos a ambientes constantemente fríos parecen estar - muy adaptados para funcionar a estas temperaturas, pero han perdido aparentemente su capacidad de aclimatación térmica (Packard, 1972b).

-b.-Termorregulación.-

Ciertos grupos de peces, como el atún y algunos condriactios, muestran una temperatura en el cerebro, en los ojos y en los músculos entre 2 y 12°C - por encima de la del ambiente (Carey et al., 1971; - Linthicum y Carey, 1972; Sugimoto y Nosoh, 1971); es tos gradientes térmicos se mantienen mediante las re tia mirabile, las cuales evitan las pérdidas del calor de origen metabólico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no se trata de una auténtica termorregulación, sino del mantenimiento de un gradiente térmico fijado entre el músculo y la temperatura del agua (Hazel y Prosser, 1974).

El comportamiento termorregulador parece no estar ni muy bien descrito ni bien comprendido en el caso de los peces; no obstante, existen una serie - de descripciones (Fry y Hochachka, 1970). Sin embargo, se sabe que el método termorregulador principal de los anfibios es el comportamiento, en el cual se han establecido dos grandes categorías: el relacionado

do con la actividad general a través de las estaciones, en el que estarían incluidos fenómenos tales como la hibernación y el torpor, y los de naturaleza específica y diaria, como la toma de sol, la salida del agua para favorecer la evaporación y la actividad nocturna, siendo estos tipos de comportamiento esenciales en los anfibios terrestres y semiterrestres (Brattstrom, 1970).

-2.-Organos y tejidos.-

-A.-Compensación térmica instantánea.-

Es posible que las medidas de la respiración de los tejidos con respecto a la temperatura guarden cierta relación con las obtenidas del animal entero. Así, por ejemplo, se ha observado que las curvas de respiración-temperatura de homogenados de hígado de Salamandra atra presentan una meseta insensible a la temperatura en la región correspondiente a las temperaturas preferidas, la cual coincide con la de la meseta presente en las curvas respiración-temperatura de homogenados de todo el animal (Knapp, 1974).

-B.-Compensación térmica por aclimatación.-

La aclimatación a la temperatura, medida en términos de comportamiento, puede referirse en parte a cambios adaptativos de la función neural. Obviamente, el sistema nervioso, a través de su recepción sensible, es el órgano primario de la adaptación a la temperatura ambiente (Lagerspetz, 1974). Además, la investigación neurofisiológica y farmacológica ha confirmado el punto de vista expresado por Sherrington (1906) de que los contactos funcionales entre dos células nerviosas, las sinapsis, y los contactos funcionales entre células nerviosas y efectores, son, en muchos casos, las partes más sensibles y adaptativas en el sistema nervioso y en el animal entero. Por ejemplo, los estudios sobre la transmisión neuromuscu

lar en Rana pipiens han indicado que la función sináptica es más sensible a la temperatura que el nervio o el músculo; además, la sensibilidad de las membranas postsinápticas a la acetilcolina aumenta aparentemente durante la aclimatación al frío (Jankowsky y Korn, 1965).

-a.-Consumo de oxígeno.-

En muchos casos, las adaptaciones del consumo de oxígeno de todo el animal se reflejan en compensaciones comparables del consumo de los tejidos después de un periodo de aclimatación al frío; sin embargo, no todos los tejidos examinados reflejan el modelo de aclimatación de todo el animal ni todos los tejidos muestran el mismo grado de aclimatación. Por ejemplo, la culebra Thamnophis sirtalis parietalis aclimatada a 4°C tiene un descenso en la tasa metabólica del hígado y un aumento en la del corazón; el metabolismo del músculo esquelético crece con la aclimatación al frío en los animales de verano, mientras que no se altera en los animales de invierno (Hoskins y Aleksyuk, 1973). El consumo de oxígeno de los cortes de músculo esquelético de Rana temporaria muestra un descenso compensador con la aclimatación al calor de los animales de invierno pero no en los de verano (Lagerspetz et al., 1974).

-b.-Fluidos corporales y sistema circulatorio.-

El pH de la sangre de los poiquiloterms varía en proporción inversa con la temperatura. Se ha observado que el pH sanguíneo de ranas, sapos y tortugas aclimatados a temperaturas entre 5 y 35°C desciende de forma casi lineal en función de la temperatura corporal, con un valor de $\Delta\text{pH}/^{\circ}\text{C}$ de -0,016, yendo acompañados estos cambios en el pH de un descenso en los niveles de Pco_2 y de un aumento en las concentraciones de bicarbonato con el frío (Howell et al., 1970). El $\Delta\text{pH}/^{\circ}\text{C}$ del agua neutra es de -0,017 entre

3 y 37°C; estas diferencias entre el pH sanguíneo y el del agua neutra se mantienen aproximadamente constantes, sugiriendo que los poiquiloterms no regulan la constancia del pH, el P_{CO_2} o el bicarbonato, sino un cierto grado de alcalinidad en relación con el punto neutro del agua (Rahn, 1965).

Los niveles de los electrolitos mayoritarios del suero $-Cl^-$ y Na^+ tienden a aumentar en los teleósteos marinos y a disminuir en los de agua dulce con la aclimatación a baja temperatura, según se ha podido deducir de una serie de experimentos (Umminger, 1969, 1969b, 1970), reflejando probablemente un impedimento de la regulación iónica en ambos grupos de peces con el frío; también se ha sugerido que esto podría representar una adaptación fisiológica que conserve energía en el frío y que podría deberse a un gasto limitado de aquella mejor que a un impedimento de la osmorregulación per se (Prosser et al., 1970). Sin embargo, estos cambios parecen ocurrir a temperaturas extremas, ya que la mayoría de las evidencias sugieren que los teleósteos son buenos reguladores osmóticos e iónicos en su zona de tolerancia de temperaturas (Hazel y Prosser, 1974). Así, la osmorregulación parece mantenerse, al menos en los peces de agua dulce (Umminger, 1971), describiéndose una compensación perfecta de la osmolalidad sérica en Cyprinus carpio con las bajas temperaturas, a pesar de observarse un descenso en los electrolitos séricos (Houston et al., 1970).

En Rana temporaria, el contenido de Ca, Mg y Zn de hueso, músculo, corazón y riñón es, en general, alto en verano y otoño y bajo en invierno y primavera, con la salvedad de que, durante la época de ayuno del invierno, el hueso parece ser una reserva efectiva de Ca y Mg, y que, durante la puesta, el contenido de Mg del músculo decrece mucho (Pasanen y -

En algunos casos, se ha podido detectar un - aumento en el contenido tisular de agua en peces dulceacuícolas aclimatados al frío (Hazel y Prosser, - 1974). En Rana temporaria, el contenido de agua es, en general, alto en el músculo, corazón y riñón en - ambiente acuático, esto es, en invierno y primavera, y bajo en el terrestre, es decir, en verano y otoño, teniendo el hueso sus valores máximos en verano; durante la primavera, el contenido de agua de muchos órganos es bajo, estando relacionado posiblemente - con el rápido crecimiento de los ovarios de las hembras y de la linfa de los machos (Pasanen y Koskela, 1976). Por otro lado, se ha observado que el contenido de agua de todo el animal, en la rana, aumenta - con la temperatura ambiental y desciende con ella - (Holzapfel, 1937; Grainger, 1960; Jankowsky, 1960; Miller et al., 1968).

Debido al efecto de la temperatura sobre la solubilidad de oxígeno, un poiquiloterma acuático expuesto a altas temperaturas se enfrenta con una mayor demanda de oxígeno en un ambiente que es relativamente hipóxico. En los teleósteos dulceacuícolas, este problema se soluciona, al menos parcialmente, - aumentando la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre después de la aclimatación al calor (De - Wilde y Houston, 1967; Houston y De Wilde, 1968; 1969; Grigg, 1969). Se ha sugerido que la capacidad de bombeo del sistema circulatorio puede ser mayor con la aclimatación al calor (Hart, 1957), y se ha observado que hay mayor aporte de sangre al músculo en ciprinos aclimatados a 25°C que en los de 5°C (Das y Prosser, 1967). Se han descrito ajustes compensadores en la frecuencia cardiaca en la lagartija Uta (Murrish y Vance, 1968) y en ranas sumergidas (Jones, 1972) y un descenso progresivo en la frecuencia cardiaca de

Rana temporaria de invierno aclimatada a 25°C al exponerla a 5°C, mostrando un ligero aumento inicial, y alcanzando los niveles más bajos a los 4 días, manteniéndose en ellos a partir de este 4º día de exposición al frío (Harri, 1974b). Por otro lado, se han descrito una serie de criterios que diferencian a las ranas en hibernación de las de verano aclimatadas al frío, entre los que están: descenso en el volumen sanguíneo, número de eritrocitos y porcentaje de hemoglobina; descenso e irregularidad de la frecuencia cardíaca, la cual no aumenta linealmente con la temperatura; y aumento del tamaño celular (Holzapfel, 1937). Se han descrito también cambios lineales en la frecuencia cardíaca frente a la temperatura en sapos durante el verano, mientras que en invierno esta relación solo resultó lineal entre los 14 y 23°C (Stier y Bock, 1966). Se ha mostrado un aumento en el contenido de oxígeno y dióxido de carbono de la sangre de Bufo melanostictus hibernante (20-22°C) frente al animal no hibernante (28-30°C), posiblemente debido al aumento de la capacidad transportadora de oxígeno por la mayor concentración de hemoglobina y las mayores cantidades de CO₂ disuelto en plasma debidas a la hemoconcentración (Boral y Deb, 1966).

También podrían estar implicados en la respuesta aclimatatoria ajustes en la eficacia de extracción y ventilación, de manera que una combinación de todos estos factores compensaría la demanda de oxígeno aumentada en las altas temperaturas (Hazel y Prosser, 1974), según se deduce de la observación de que la tensión de oxígeno de la sangre arterial y del músculo esquelético blanco de Anguilla no varía con la temperatura de aclimatación (Jankowsky, 1968).

-c.-Digestión.-

La aclimatación de la función digestiva y del transporte intestinal lleva consigo también cambios

inducidos por la temperatura. Así, se han observado ajustes compensadores en la tasa y contenido enzimático de las secreciones gástricas en peces, siendo, al parecer, la digestión más rápida a alta temperatura (Smit, 1967; Owen y Wiggs, 1971). Estos cambios, en algunos casos, afectan a la naturaleza de las proteínas transportadoras, por ejemplo de sodio (Smith, 1966), de manera que la proteína sintetizada en el frío tiene mayor afinidad por el sodio que la de calor, produciéndose un efecto compensador perfecto. Esto podría influir en la tasa de captación activa tanto de iones, como de glucosa, como de aminoácidos, por las células de la mucosa intestinal, aunque son también importantes los efectos de las variaciones en la composición de las membranas, ya que pueden regular, a su vez, el flujo pasivo de materiales a partir de las células de la mucosa (Smith y Kemp, 1971).

-d.-Variaciones en los niveles de productos metabólicos.-

Se ha podido detectar que el contenido de glucógeno del cerebro del pez Scardinius erythrophthalmus es mayor entre los meses de octubre y febrero, así como que el contenido de glucógeno del cerebro de sc ie nd e ci e n d e con la a c l i m a t a c i o n a tem p e r a t u r a s a l t r a s m i e n t r a s q u e el de glu c o s a no var i a ; por otro lado, el con t e n t e n i d o de ambos productos metabólicos no var i a en el h i f g a d o con la a c l i m a t a c i o n a distintas temperaturas. En el ciprino se han observado modelos semejantes, así como que el contenido de glucógeno del cerebro va aumentando paralelamente al tiempo de aclimatación a la baja temperatura (Breer y Rahmann, 1974).

Los valores de glucosa en sangre no varían en Rana temporaria después de la puesta de huevos, pero durante la época de puesta son relativamente altos - (Smith, 1954; Miller, 1961), posiblemente relacionados con un aumento en la actividad metabólica general y

con un aumento en la actividad de la hipófisis, las glándulas interrenales y la tiroidea y las gónadas. Durante la hibernación, el descenso de glucosa en sangre va acompañado de un aumento en el contenido de glucógeno del hígado y de todo el cuerpo (Miller, - 1961). En general, en los anfibios aclimatados al - frío el nivel de glucosa en sangre es más bajo que en los aclimatados al calor (Hermansen y Jørgensen, 1969; Jungreis y Hooper, 1970; Jungreis, 1970; Harri y Lindgren, 1972), siendo esta diferencia mayor en los animales de verano, puesto que los niveles de estos animales aclimatados al frío son inferiores a - los de invierno en estas mismas condiciones (Harri et al., 1972). En las ranas de invierno, el nuevo nivel de glucosa provocado por la aclimatación al frío o al calor se alcanza a los 6 días de esta, mientras que en las de verano el cambio es completo después del primer día (Harri, 1973). Los esteróides adrenales y la ACTH (Hanke et al., 1969), el glucagon (- Wright, 1959; Hanke y Neumann, 1972; Penhos y Ramey, 1973), la adrenalina (Tindal, 1956; Wright, 1956; - 1959; Wright et al., 1958; Harri, 1974b) y la noradrenalina (Tindal, 1956) inducen un aumento en el contenido sanguíneo de glucosa en anfibios, o una liberación de esta a partir del hígado, mientras que la insulina hace descender estos niveles (Smith, 1953; - Wright, 1959), posiblemente, evitando su liberación a partir del hígado (Packard y Randall, 1976).

El contenido de glucógeno de hígado y músculo y el de lípidos de los cuerpos grasos es más alto en el otoño (Koskela, 1975; Byrne y White, 1975) y más bajo en la primavera, después de la puesta, -- mientras que el contenido de agua y proteínas se comporta de manera inversa. Los niveles de ácidos gra--sos libres en plasma son más altos en Rana tempora--ria del mes de septiembre que en las de junio y el contenido de glicerol es mayor en los animales accli-

matados al frío que en los aclimatados al calor, mientras que la 5-hidroxitriptamina hace descender los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres en los animales de invierno aclimatados al calor y en los de verano aclimatados al frío, y no estimula la lipólisis en los cuerpos grasos in vitro (Harri et al., - 1972).

-C.-Compensación térmica evolutiva.-

Si se compara la termostabilidad del músculo de poblaciones intraespecíficas separadas que habitan en ambientes térmicos diferentes, no se notan ajustes compensadores, indicando que la termostabilidad celular en los poiquilotermos es una característica específica de especie y conservativa; en cambio, en las comparaciones interespecíficas, la termostabilidad celular de tejidos homólogos de especies afines está correlacionada con las condiciones ambientales; así, las células de los poiquilotermos que viven en ambientes cálidos tienden a mostrar mayor resistencia al calor que las células comparables de organismos que viven en ambientes más fríos, indicando probablemente adaptación térmica. Estos caracteres no suelen ser modificables por la aclimatación térmica (Ushakov, 1964).

Se ha sugerido que la lesión por calor y la muerte celular tienen su origen en la desnaturalización de los complejos protéicos, basándose en las grandes correlaciones que existen entre la resistencia al calor de las proteínas y la de las células de las que se han obtenido, ya que la resistencia al calor de una célula está determinada por la termostabilidad de sus sistemas protéicos menos resistentes. Se han establecido muchas correlaciones de este tipo en multitud de especies (ver Hazel y Prosser, 1974). Por otro lado, se ha estimado que la labilidad debida al frío puede ser un índice mejor de la adaptación evolutiva que la estabilidad frente al calor (Cowey,

-3.-Metabolismo celular y cambios estructurales.-

-A.-Compensación térmica instantánea.-

La independencia térmica del metabolismo de todo el animal podría ser el resultado de las propiedades de, por ejemplo, las mitocondrias, puesto que se han aportado valores bajos de Q_{10} para la oxidación de piruvato y succinato (medidas a bajas concentraciones de sustrato) en preparaciones mitocondriales de algunos invertebrados (Hazel y Prosser, 1974).

También se han demostrado los efectos inmediatos de la temperatura en los puntos de ramificación del metabolismo, donde la efectividad de dos rutas metabólicas compitiendo por un mismo sustrato varía con la temperatura (Hochachka, 1968; Fry y Hochachka, 1970).

-B.-Compensación térmica por aclimatación.-

A nivel celular, se ha observado que la aclimatación a la temperatura afecta tanto a la tasa de flujo de carbono hacia una ruta determinada como a la contribución de las distintas rutas metabólicas al metabolismo total (Hochachka, 1967). En general, las observaciones, realizadas en muchos de los casos en peces, se pueden resumir en los siguientes puntos:

-a.-Glucolisis.-La tasa de flujo de carbono hacia la glucolisis aumenta con el frío hasta 5 veces (Hochachka, 1967) en truchas, y la producción anaerobia de ácido es mayor en las branquias de la carpa crucero aclimatada al frío (Ekberg, 1962). La generalización de este efecto como una característica esencial de la aclimatación al frío se ha puesto en duda debido a la ausencia de ajustes compensadores en la actividad catalítica de ciertas enzimas glucolíticas, así como las observaciones de que la respiración tisular

de las branquias de la carpa crucero (Ekberg, 1962) y del músculo de trucha (Hochachka y Hayes, 1962) es más sensible a la inhibición por ácido iodoacético en los animales aclimatados al calor. Esto pone de manifiesto quizá una preponderancia de la glucólisis a temperaturas altas y la utilización de rutas alternativas del metabolismo de hidratos de carbono en la aclimatación al frío (Hazel y Prosser, 1974).

-b.-Ciclo de las pentosas.-

La aclimatación al frío parece provocar una marcada activación del ciclo de las pentosas, pasando de contribuciones muy bajas a realizar un 10% del metabolismo de la glucosa (Fry y Hochachka, 1970); así, el consumo de oxígeno total del hígado de ciprino aumenta un 43% en los animales aclimatados al frío, - mientras que la respiración mitocondrial aumenta solo un 12%, lo cual supone un aumento de la oxidación extramitocondrial con la aclimatación al frío (Kanungo y Prosser, 1959). El dióxido de carbono producido por la oxidación de glucosa marcada con C^{14} se deriva, principalmente, de la posición C_1 en truchas aclimatadas al frío, y de la posición C_6 en los animales aclimatados al calor, indicando claramente una mayor actividad del ciclo de las pentosas con el frío (Hochachka y Hayes, 1962).

-c.-Ciclo de Krebs y transporte de electrones.-

Con la aclimatación al frío, el ciclo de Krebs parece aumentar, aunque otras veces se mantiene en los mismos niveles e incluso desciende, dependiendo de especies y tejidos, mientras que la función de la cadena de transporte de electrones parece aumentar (Freed, 1965; Hochachka y Hayes, 1962; Caldwell, 1969). Las elevadas tasas de oxidación de acetato y palmitato en el músculo de la trucha aclimatada al frío ponen de manifiesto, tal vez, aumentos en la actividad tanto del ciclo de Krebs como de la cadena

respiratoria (Dean, 1969). A partir de un aumento en la sensibilidad de la respiración tisular del hígado del ciprino aclimatado al frío frente a inhibidores tales como el amital, el cianuro y la azida, se ha podido deducir la posibilidad de un aumento en la contribución del ciclo de Krebs al metabolismo total en frío (Kanungo y Prosser, 1959).

-d.-Metabolismo de lípidos.-

Se ha podido observar un aumento en la lipogénesis con la aclimatación al frío, ligero en algunos casos (Hochachka y Hayes, 1962; Dean, 1969), aunque en otros, la síntesis de ácidos grasos puede aumentar hasta 20 veces (Knipprath y Mead, 1968). Así, la aclimatación al frío de los poiquilothermos parece producir un aumento en el metabolismo lipídico unido a un mayor grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos, así como cambios cualitativos y cuantitativos complejos en las especies de estos, por ejemplo aumento en los fosfolípidos de etanolamina, y en la posición específica de los ácidos grasos (Miller et al., 1976; Cossins, 1976). Estos cambios se han observado en una amplia variedad de especies a todos los niveles de organización biológica, aunque los ácidos grasos implicados demuestran una especificidad considerable con respecto a la especie y al tejido. Esta alteración va acompañada generalmente por la conversión de los ácidos grasos saturados característicos de la alta temperatura en sus correspondientes mono y dienoicos y, frecuentemente, por la elongación y la desaturación, produciendo un nivel más alto de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con el frío (Hazel y Prosser, 1974; Miller et al., 1976; Cossins, 1976).

Un ejemplo de estos cambios podrían ser las observaciones realizadas en Rana esculenta aclimatada al frío, en las que se ha comprobado una mayor incor

poración de acetato marcado en la fracción de ácidos grasos no saturados del hígado y los cuerpos grasos que en las fracciones correspondientes de los animales aclimatados al calor, aumentando las proporciones de ácidos grasos polienuicos, con un descenso en los niveles de palmitato (16:0), estearato (18:0) y oleato (18:1) y unos niveles relativos más altos de los ácidos linoleico (18:2), araquidónico (20:4) y docosatetraenoico (22:4) con la aclimatación al frío (Baranska y Wlodawer, 1969).

A nivel de orgánulo, se ha comparado la composición de lípidos de mitocondrias aisladas del tejido branquial de ciprinos aclimatados a 10 y a 30°C, observándose que aumenta la insaturación de los ácidos grasos en el frío, debido a niveles elevados de ácidos monoinsaturados y de araquidónico, eicosapentaenoico (20:5) y docosapentaenoico (22:5) (Caldwell y Vernberg, 1970).

La ventaja selectiva de estos cambios compensadores de la composición lipídica parece ser el hecho de que los lípidos presentes en la aclimatación al frío se caracterizan por tener puntos de fusión más bajos, mayores áreas por molécula en una película monomolecular y mayor movilidad a temperatura baja que sus análogos saturados, manteniendo probablemente la permeabilidad y la fluidez de las membranas independientes, al menos parcialmente, de las fluctuaciones de la temperatura ambiental, evitándose la transición de una fase líquido-cristalina a una cristalina que ocurriría al cambiar de temperatura la membrana dentro de un intervalo fisiológico (Van Deenen, 1969; Hazel, 1973; Hazel y Prosser, 1974). Por ejemplo, se ha observado que los sinaptosomas del cerebro de ciprino aclimatado a 25°C se vuelven más viscosos al enfriarlos que los de los peces aclimatados a 5°C, estando relacionados estos cambios con alteraciones en la composición de ácidos grasos semejantes

a los descritos anteriormente (Cossins y Prosser, 1977, 1977b).

-e.-Síntesis de glucógeno.-

La aclimatación al frío parece provocar también un aumento en la síntesis de glucógeno (Hochachka, 1967; Fry y Hochachka, 1970), según se puede deducir además del aumento en el contenido de este producto en diversos tejidos apuntado más arriba.

-f.-Síntesis de proteínas.-

Se ha observado que la tasa de síntesis de proteínas puede mostrar, al menos en ciertas especies y tejidos, cambios compensadores después de un período de aclimatación. Por ejemplo, se ha descrito un aumento en la tasa de síntesis general de proteínas, medida por la incorporación de aminoácidos marcados a la proteína, en hígado de ciprino aclimatado al frío (Das y Prosser, 1967) y en el pez sapo, Opsanus tau (Haschemeyer, 1968); este aumento es relativamente no específico, ya que se ha observado en todas las fracciones subcelulares de branquias, hígado y músculo del ciprino aclimatado al frío (Das, 1967). En el hígado del pez sapo, el tiempo medio requerido para el montaje de una cadena polipeptídica de longitud mediana completa desciende con la aclimatación al frío, y puesto que el contenido de ribosomas del hígado no se altera con esta y las tasas sintéticas computadas a tiempo constante están de acuerdo con las determinaciones directas de la tasa de incorporación de aminoácidos marcados a las proteínas, se pudo concluir que la tasa de formación de enlaces peptídicos era un 70% mayor en los peces aclimatados al frío (Haschemeyer, 1969c).

-g.-Síntesis de ácidos nucleicos.-

Se ha apuntado un aumento en la tasa de incorporación de citidina- H^3 en el RNA microsomal y nuclear

del hígado y músculo de ciprino con la aclimatación al frío, lo cual supone unas tasas más elevadas de síntesis y de renovación (turnover) (Das, 1967).

-h.-Microambiente iónico.-

El microambiente iónico puede alterarse durante la aclimatación al frío (Heinicke y Houston, 1965). Se han realizado también estudios sobre las variaciones del pH intracelular en los músculos cardíacos y estriado de la rana toro aclimatada; aunque el pH intracelular del músculo esquelético cambia de forma paralela al de la sangre, con un $\Delta\text{pH}/^{\circ}\text{C}$ de $-0,014$ a $-0,01$, el del músculo cardíaco parece estar regulado a $7,3$ y no varía con la temperatura de aclimatación (Reeves y Wilson, 1969).

La mayoría de los cambios citados en los apartados anteriores se han observado en el hígado, tejido en el que la reorganización metabólica es muy compleja; en otros tejidos, como las branquias, el músculo o el cerebro, las reacciones exergónicas están acopladas a funciones muy especializadas, con lo que las reorganizaciones metabólicas pueden resultar más abreviadas. Por ejemplo, el ciclo de las pentosas no es importante en el metabolismo del cerebro o del músculo, por lo que los ajustes de este en la participación en el metabolismo de la glucosa podrían no ser relevantes y, por lo tanto, no darse en estos tejidos durante la aclimatación al frío (Fry y Hochachka, 1970).

-C.-Compensación térmica evolutiva.-

Puesto que muchos de los procesos biológicos dependen de la integridad funcional de los sistemas de membranas, no es raro que la composición lipídica de la membrana refleje también la historia evolutiva del organismo y el tipo de ambiente al que se haya adaptado. Así, por ejemplo, los ácidos grasos del cerebro del pez antártico Trematomus poseen solo trazas

de ácidos C_{12} y C_{14} , mientras que los ácidos grasos poliinsaturados del tipo C_{24} representan casi un 7% del total (Morris y Schneider, 1969). Las membranas de los sinaptosomas del coto espinoso aclimatado a $0,5^{\circ}C$, de un pez del desierto ($34^{\circ}C$) y de la rata ($37^{\circ}C$), muestran compensación térmica evolutiva con respecto a la viscosidad, ya que la adaptación a las altas temperaturas se correlaciona bien con la presencia de mayores proporciones de ácidos grasos saturados en los fosfoglicéridos, y menos con el índice de insaturación (Cossins y Prosser, 1977). Las diferencias en la composición lipídica se reflejan también en las características térmicas de las enzimas respiratorias de los homeotermos y de los poiquiloter_{mos} (Hazel y Prosser, 1974).

-4.-Actividades enzimáticas.-

-A.-Compensación térmica instantánea.-

Algunas enzimas de poiquiloter_{mos} muestran una Q_{10} para la actividad muy próxima a la unidad, - con lo que esta actividad permanece independiente de la temperatura dentro de un intervalo determinado de temperaturas. Esto ocurre, por ejemplo, en la LDH muscular del pez pelágico Hygophum atratum cuando se realizan las medidas a bajas concentraciones de sustrato (Valkirs, 1978).

-B.-Compensación térmica por aclimatación.-

Las compensaciones mencionadas en las funciones de todo el animal, de los órganos y tejidos y de las células, se podrían explicar, en parte, a nivel molecular por los cambios inducidos por la temperatura en la actividad enzimática, ya que un gran número de enzimas muestran modelos compensadores de la actividad catalítica durante la aclimatación térmica. - Las enzimas que muestran aclimatación compensadora (tipos 2 y 3 de Precht) están asociadas a las rutas metabólicas productoras de energía expuestas en el apartado 3.B., esto es, enzimas glucolíticas, gluconeog

génicas, del ciclo de las pentosas, del ciclo de Krebs, transporte de electrones, enzimas digestivas de animales alimentados, Na^+/K^+ -ATPasa de branquias e intestino, y la enzima sintetizante de proteínas aminoacil transferasa. La mayoría de estas enzimas se caracterizan por cambios en la actividad específica, medidos por la razón de esta actividad en el animal aclimatado al frío a la del animal aclimatado al calor (frío/calor), cuando estas actividades se ensayan a una temperatura intermedia a las de aclimatación, con valores de la razón frío/calor entre 1 y 2, después de la aclimatación al frío, a excepción de las enzimas del ciclo de las pentosas, las cuales parecen mostrar mayor compensación. Estos valores se correlacionan razonablemente con los cambios descritos en el metabolismo celular, tisular e, incluso, de todo el animal (Hazel y Prosser, 1974).

Hay casos en los que las mismas enzimas que en una especie dan compensación parcial o completa, en otra la dan inversa o no presentan compensación, esto es, adaptaciones tipo 5 y 4 de Precht respectivamente. Existen varias explicaciones al respecto - (Hazel y Prosser, 1970): 1) No hay cambios en la actividad enzimática si el animal presenta letargo o sueño en el frío o en el calor, esto es, no se mantiene un comportamiento activo; esto se refleja en la compensación tipo 5 de la enzima málica y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de Rana esculenta (Baranska y Wlodawer, 1969) y la ATPasa mitocondrial de tortugas (Rotermund y Privitera, 1972). Estas compensaciones inversas de la actividad enzimática suelen estar de acuerdo con los datos de consumo de oxígeno de todo el animal de los organismos que experimentan torpor inducido por el frío. Sin embargo, se sabe que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de la larva de Rana pipiens (Audilet y Gray, 1973) y la succinoxidasa de hígado de Rana temporaria adulta si son capaces de mostrar compensación tipo 2 o 3 de Precht (Smith, 1973).

2) Las especies muy estenotermas exhiben frecuentemente una capacidad limitada para la compensación térmica, como se ha observado en el pez antártico Trematomus (Somero et al., 1968). 3) El estado de nutrición podría superar a la temperatura en la producción de modificaciones de la actividad enzimática, posiblemente debido a la ausencia de estimulación por sustrato, puesto que los animales en ayuno muestran una adaptación tipo 4 o 5 en sus enzimas digestivas. Esto podría ilustrarse con la actividad succínico deshidrogenasa de Eisenia, una lombriz (Kirberger, 1953) y la proteasa de la carpa (Mews, 1957). 4) Puede haber variaciones estacionales en la capacidad de mostrar compensaciones a la temperatura, puesto que la succínico deshidrogenasa de Idus de invierno tiene compensación (Jankowsky y Korn, 1965), mientras que la de los animales de verano no (Künnemann et al., 1970). 5) La compensación inversa de la actividad enzimática puede ser adaptativa con respecto a funciones específicas tales como la eliminación de productos de desecho del metabolismo potencialmente tóxicos; en este grupo se incluyen enzimas asociadas a los lisosomas, peroxisomas, metabolismo de la urea y del nitrógeno, además de la Mg-ATPasa, acetilcolinesterasa y colinaciltransferasa. La mayoría de estas enzimas están relacionadas con la rotura de productos metabólicos, y, puesto que muchos productos intermedios del metabolismo de hidratos de carbono se pueden acumular en los ciprinos aclimatados al calor (Freed, 1971) y se han observado unos niveles altos de excreción nitrogenada endógena en el pez sol de branquias azules aclimatado al calor (Savitz, 1969), las compensaciones de tipo 5 podrían resultar verdaderamente adaptativas (Hazel y Prosser, 1974).

La inclusión de las enzimas glucolíticas en la categoría de compensadoras se ha puesto en duda por la observación de que, en muchas especies, algunas de estas enzimas, incluida la LDH, muestran adap

tación tipo 5 en lugar de tipo 3. Se ha sugerido que podría ser una desventaja reducir la capacidad glucolítica en un ambiente cálido, donde la disponibilidad de oxígeno está algo reducida y, consecuentemente, el metabolismo anaerobio favorecido, y aumentar la capacidad glucolítica en frío, donde el ambiente es relativamente aerobio (Somero, 1973; Wilson, 1973). Este punto de vista coincide con las observaciones que indican que hay una predominancia de la ruta glucolítica en calor y una utilización de rutas alternativas del metabolismo de hidratos de carbono (ciclo de las pentosas) en el frío, pero no se apoya en la mayoría de las observaciones sobre medidas directas de la actividad catalítica de las enzimas glucolíticas. Se ha tratado de explicar, al menos parcialmente, estas observaciones (Hazel y Prosser, 1974): 1) La elevación de la capacidad glucolítica en el frío sería adaptativa en el sentido de proporcionar sustratos para una oxidación posterior, lo cual sería válido si dicha capacidad en los individuos aclimatados al calor (en conjunción con otras rutas productoras de acetil-CoA) no fuera suficiente para satisfacer la demanda aumentada de sustratos asociada al mayor metabolismo aerobio en el frío. 2) La compensación de las enzimas glucolíticas puede ser especialmente pronunciada en el músculo esquelético blanco, el cual posee una capacidad limitada para el metabolismo aerobio. Por lo tanto, si la capacidad glucolítica de los individuos aclimatados al calor es suficientemente alta y/o la contribución del músculo esquelético blanco al metabolismo total del músculo es suficientemente pequeña, el proceso de aclimatación no necesitaría de la compensación de las enzimas glucolíticas. No obstante, la magnitud de la compensación descrita para las enzimas glucolíticas es, generalmente, menor que la que caracteriza a las enzimas de la cadena de transporte de electrones y del ciclo de Krebs (Hazel y Prosser, 1974; Shaklee et al., 1977).

Por otro lado, se ha puesto en duda la extrapolación realizada a partir de los resultados de un pequeño número de enzimas de uno o dos tejidos, que ha conducido a interpretaciones de un modelo general de aclimatación para todos los tejidos de una especie. La reorganización metabólica que ocurre durante la aclimatación térmica podría ser, y probablemente lo sea, un proceso tejido-específico. En el cerebro del pez sol verde, por ejemplo, aumentan las enzimas glucolíticas con el frío, mientras que en el músculo esquelético los niveles de estas enzimas descienden con el frío, lo cual parece poner en cuestión la validez de referirse a las enzimas como que muestran compensación positiva o negativa, ya que parece claro que la dirección y magnitud del cambio de una enzima determinada depende, a menudo, del tejido utilizado - (Shaklee et al., 1977).

-C.-Compensación térmica evolutiva.-

Se han descrito numerosas correlaciones entre la termostabilidad protéica y la temperatura del hábitat de los poiquiloterms. Los estudios comparados de la termostabilidad de las actividades miosin-ATPasa, aldolasa, colinesterasa, fosfatasa alcalina y adenilato kinasa de una gran variedad de especies de poiquiloterms vertebrados e invertebrados indican que las proteínas más estables frente al calor son las de las especies más termofílicas (Ushakov, 1967). La termostabilidad de las enzimas mitocondriales succinoxidasa, malato deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa, monoamino oxidasa y citocromo oxidasa no se correlacionan con la historia filogenética de las especies, pero si se corresponden, en muchos casos, con el ambiente térmico al que están adaptadas las especies (Smith, 1973b; 1973c). Hay pocos estudios comparados sobre estabilidad frente al frío, aunque este tipo de estudios parece más definitivo que la estabilidad frente al calor; se ha demostrado que hay una serie de enzimas de homeotermos y de microorganismos.

mos termófilos que son muy lábiles al frío, lo cual podría hacer inoperantes ciertas rutas metabólicas con el frío (Beyer, 1972).

-II.-MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACION A LA TEMPERATURA EN LOS POIQUILOTERMOS.-

-1.-Iniciación de la respuesta de aclimatación.-

No está clara la naturaleza del estímulo inductor primario en la aclimatación térmica de los poiquiloterms, ni el papel del sistema nervioso central ni el del endocrino, de forma que, en muchos casos, parece existir una respuesta celular directa predominante. En peces, se ha propuesto una combinación de estos mecanismos (Precht, 1964; 1964b), aunque, en algunos casos, se ha buscado una participación de factores hormonales, principalmente de la tiroides, y neurohormonales en la iniciación de la respuesta de aclimatación (Parvatheswararao, 1968; Fry y Hochachka, 1970).

En anfibios, principalmente en el género Rana, se ha hecho hincapié en la participación de la tiroides en la respuesta de aclimatación y en la producción de calor. Así, en Rana pipiens, parece que la temperatura gobierna la respuesta metabólica de los tejidos a las hormonas tiroideas, puesto que las ranas aclimatadas a 25°C responden con un aumento del 21% en el consumo de oxígeno del hígado a la tiroxina, mientras que las aclimatadas a 15°C no (Packard y Packard, 1975). En esta misma especie, se ha propuesto una posible participación de las hormonas en la regulación de la actividad enzimática en la aclimatación a la temperatura (McWhinnie y Oeltgen, 1971). En R. temporaria, las inyecciones repetidas de 5-hidroxitriptamina o adrenalina a animales de invierno aclimatados a 25°C inducen alteraciones en la tasa metabólica y la función tiroidea similares a la de la aclimatación al frío (Harri, 1973b; 1974; Lager---spetz et al., 1974), de forma que se propone una in-

interesante cadena de acontecimientos en el inicio de la aclimatación en este anfibio, comenzando por el sistema nervioso central, el cual liberaría 5-hidroxi triptamina por un lado, mientras que las neuronas a-drenérgicas influirían de alguna manera sobre la tiroides y las adrenales, y la interacción y la acción conjunta de estos factores sería la responsable de los cambios observados en las funciones del animal. Sin embargo, en Xenopus laevis se ha podido observar que el efecto de la temperatura sobre las células hepáticas parece ser directo (Tsugawa, 1976).

El análisis del tiempo que tardan en producirse los cambios en los diversos parámetros fisiológicos durante la aclimatación térmica conduciría a la identificación de las primeras respuestas, que podrían inducir el resto del proceso de la aclimatación. Así, se han descrito cambios a las tres horas de poner al animal en la nueva situación, mientras que los más tardíos se han localizado a las 3 o 4 semanas (Hazel y Prosser, 1974). Las alteraciones en las concentraciones de metabolitos suelen ser las más tempranas, lo que indica probablemente un efecto directo diferencial de la temperatura sobre algunos sistemas enzimáticos; estas variaciones tal vez pudieran disparar las respuestas de aclimatación a largo plazo, si los metabolitos en cuestión funcionasen como inductores o represores de la expresión génica y de la síntesis de proteínas. Por otro lado, la actividad de la aminoaciltransferasa aumenta un 60% después de la aclimatación al frío (Haschemeyer, 1969b), mientras que la incorporación de aminoácidos a las proteínas hepáticas in vivo aumenta un 70% (Haschemeyer, 1969), interpretándose la correlación existente como que el aumento de la síntesis protéica durante la aclimatación al frío podría estar controlado por el nivel de transferasa activa, siempre que este paso, la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma, sea limitante in vivo.

Se ha podido establecer que ciertos efectos de la aclimatación no son más que la manifestación de un efecto directo prolongado de la temperatura y, consecuentemente, no implicarían una retroacción (feed-back) sobre el sistema sintetizante de proteínas (Hazel y Prosser, 1974).

-2.-Mecanismos implicados en la compensación de las actividades enzimáticas.-

-A.-Compensación térmica instantánea.-

-a.-Interacciones enzima-sustrato.-

Muchas enzimas de poiquilothermos se caracterizan por mostrar una relación directa entre la temperatura de medida y la K_m para el sustrato, de manera que, cuando se reduce aquella, se requiere menor cantidad de sustrato para saturar la enzima; consecuentemente, cuando se miden las tasas de catálisis a concentraciones fisiológicas de sustrato, el efecto de la disminución de la energía cinética disponible a temperaturas de medida bajas se contrarresta parcial o totalmente por un aumento en la afinidad aparente de la enzima por el sustrato. Así, la Q_{10} de las reacciones catalizadas por estas enzimas (y la pendiente de la representación de Arrhenius) es dependiente de la concentración de sustrato; si la concentración de este se reduce de los niveles de saturación a los fisiológicos, la Q_{10} de la reacción cae, debido a un aumento en la afinidad aparente por el sustrato, a temperaturas de medida bajas y puede aproximarse a la unidad (Somero, 1969; Valkirs, 1978). Este fenómeno ha sido denominado "modulación térmica positiva" para poner de manifiesto los efectos similares de los moduladores positivos y los descensos de la temperatura en los parámetros cinéticos de las enzimas (Hochachka y Somero, 1973).

Se ha comprobado que la mayoría de las enzimas de poiquilothermos en las que se ha determinado el efecto de la temperatura en la K_m para el sustrato

to, podrían mostrar una modulación térmica positiva en, al menos, una porción del intervalo de temperaturas del ambiente (Hazel y Prosser, 1974). Así, la LDH de hígado de Rana pipiens presenta un valor mínimo de K_m para piruvato de 0,02 mM entre 5 y 10°C, siendo la respuesta de la K_m independiente de la temperatura en este intervalo, mientras que entre los 10 y 25°C, la pendiente de la representación K_m -temperatura es de 0,20 (Levy y Salthe, 1971).

Las características K_m -temperatura pueden ser diferentes para las distintas isoenzimas de una determinada enzima. Por ejemplo, la LDH del músculo del cangrejo bayoneta de Alaska tiene dos variantes, una de frío y otra de calor, las cuales están presentes en todas las temperaturas ambientales; sin embargo, las temperaturas de medida mayores de 10°C inactivan virtualmente a la forma de frío, debido a la alta K_m para el piruvato de esta forma; si se reduce la temperatura de medida, la K_m de la variante de frío descende, activándose la enzima, y, como resultado, la actividad catalítica medida a 5°C excede normalmente a la medida a 10°C, a concentraciones fisiológicas de sustrato (Somero y Hochachka, 1969). Algo similar se ha observado en algunos reptiles (Aleksiuk, 1971b). El mantenimiento de sistemas isoenzimáticos complejos (la existencia simultánea de varias isoenzimas con características K_m -temperatura distintas) podría extender el intervalo de temperaturas del ambiente en las que la modulación térmica positiva produjera compensación instantánea, si la K_m de estas isoenzimas fuera sensible a la temperatura en diferentes intervalos térmicos o si la sensibilidad a la temperatura de las K_m fuera muy distinta (Hazel y Prosser, 1974).

-b.-Interacciones enzima-modulador.-

Otro mecanismo para el mantenimiento de la -

función catalítica independiente de la temperatura sería el efecto de la temperatura sobre las interacciones entre las enzimas y algunos metabolitos moduladores. Por ejemplo, las isoenzimas de LDH presentes en el músculo esquelético blanco de Gillichthys mirabilis muestran una inhibición por sustrato (piruvato) solo a temperaturas inferiores a los 25°C; consecuentemente, a altas temperaturas ambientales, cuando la disponibilidad de oxígeno se reduce y el nivel de actividad es relativamente alto, el piruvato se transforma en lactato eficazmente; sin embargo, a temperaturas bajas, cuando aumenta la disponibilidad de oxígeno, el piruvato se canaliza hacia el ciclo de Krebs (Somero, 1973).

-c.-Cambios en el microambiente catalítico.-

Es sabido que el pH de los fluidos intra y extracelulares de los poiquiloterms varía con la temperatura corporal -0,015 a -0,020 unidades de pH/°C (Rahn, 1965; Reeves y Wilson, 1969), y, por lo tanto, con la aclimatación, de forma que las enzimas que muestran dependencia del pH en un intervalo crítico (de 6,5 a 8,0) podrían estar sujetas a modulación o regulación por el pH. Así, se ha descrito que algunas enzimas de poiquiloterms tienen un óptimo de actividad a pH alcalino, como la LDH de Thamnophis sirtalis parietalis (Aleksiuk, 1971b). En un estudio cinético sobre la tasa de reducción de piruvato por la LDH₅ del músculo de ciprino se ha observado que, manteniendo unas condiciones fisiológicas de pH a distintas temperaturas, el efecto de la temperatura sobre la Km, esto es, el aumento de esta paralelo a aquella, se reduce (Wilson, 1977).

En muchos casos, el efecto directo de la temperatura sobre el pH óptimo de una enzima podría compensar el aumento postulado en el pH con el descenso de la temperatura; por ejemplo, el pH óptimo de la

malato deshidrogenasa de Th. sirtalis parietalis aumenta de 7,4 a 35°C a 8,7 a 10°C (Hoskins y Aleksyuk, 1973b).

-d.-Cambios conformacionales.-

Otro mecanismo para la compensación inmediata de la temperatura, aunque ha sido observado en pocos casos es el de los cambios conformacionales que se producen en las enzimas a causa de las variaciones térmicas. La piruvato kinasa del cangrejo bayoneta de Alaska sufre una interconversión entre dos formas de la enzima, mostrando cada una propiedades cinéticas distintas, a consecuencia de los cambios de temperatura (Somero, 1969b). Este mecanismo de elaboración instantánea de variantes enzimáticas podría proporcionar al organismo dos poblaciones funcionalmente distintas de catálisis enzimática, cada una funcionando óptimamente en regímenes térmicos restringidos, y que no requeriría los intervalos de tiempo relativamente largos asociados con la inducción de isoenzimas nuevas (Hochachka y Somero, 1973).

-e.-Puntos de ramificación del metabolismo.-

En un sistema multienzimático complejo, donde los puntos de ramificación del metabolismo crean una competición por un único sustrato, los cambios en la temperatura pudieran afectar diferencialmente la capacidad de las distintas rutas para competir por dicho sustrato, y, como resultado, una ruta podría exhibir una Q_{10} aproximadamente igual a 1, mientras que las otras mostrarían una Q_{10} considerablemente mayor que 1 (Hochachka, 1968).

-B.-Compensación térmica por aclimatación.-

-a.-Regulación de la expresión génica.-

Las respuestas de aclimatación necesitan un cierto tiempo para completarse y se pueden impedir, al menos en un caso, por la administración de puromi

cina, caracterizándose por cambios importantes en el nivel de síntesis general de proteínas y en la actividad de aminoaciltransferasa, con lo que la aclimatación fisiológica implica, probablemente, un efecto de retroacción sobre el material genético del organismo y, subsecuentemente, del sistema de síntesis de proteínas (Hazel y Prosser, 1974). Las compensaciones representan, entonces, variaciones fenotípicas inducidas por el ambiente dentro de unos límites de temperatura que están determinados genéticamente y no sujetos a modificaciones ambientales (Prosser, 1964). De acuerdo con esto, las poblaciones aclimatadas al frío y al calor de una especie pueden diferir en la porción de genotipo que se esté expresando, esto es, - pueden ser cualitativamente diferentes, o pueden diferir en la tasa con la que un determinado gen se esté transcribiendo o, alternativamente, en la tasa de degradación de un producto génico específico, esto es, las poblaciones aclimatadas al calor y al frío - difieren cuantitativamente.

-i.-Regulación cuantitativa de las enzimas.-

La aclimatación térmica puede estar mediada, en parte, por las alteraciones inducidas por la temperatura en la concentración específica de las enzimas, según se desprende del gran número de enzimas que muestran cambios compensadores de las velocidades máximas, medidas a concentraciones saturantes de substrato, frente a la temperatura. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de datos sobre el aumento de la capacidad catalítica máxima con el frío, pocos son los datos que han demostrado cambios cuantitativos en la concentración enzimática, y los que hay, se refieren a organismos unicelulares (Hazel y Prosser, 1974). Por otro lado, se han demostrado aumentos en el número de mitocondrias con la aclimatación al frío, por ejemplo, en el músculo esquelético de algunos peces (Jankowsky y Korn, 1965).

-ii.-Regulación cualitativa de las enzimas.-

Este tipo de regulación inducido por la temperatura puede llevarse a cabo según dos clases de estrategias: 1) dependiendo de las propiedades cinéticas de un solo tipo de enzima frente a la temperatura, con lo que se pueden definir las propiedades estenotermas o euritermas de esta enzima, y 2) dependiendo de las propiedades cinéticas frente a la temperatura de enzimas distintas que catalizan la misma reacción metabólica, con lo que se define la estrategia de las variantes múltiples (por ejemplo, isoenzimas) de una enzima (Somero, 1975).

-1.-Enzimas estenotermas y euritermas.-

La relación Km-temperatura puede definir, como ya se ha visto, la capacidad de respuesta de la actividad de una enzima frente a los cambios de temperatura. Una enzima que tenga una Km mínima en un estrecho margen de temperatura, tiene limitada su eficacia a este pequeño intervalo, pudiéndose definir a esta enzima como estenoterma. Un ejemplo sería la acetilcolinesterasa del pez antártico Trematomus borchgrevinki, la cual presenta una Km baja entre -1,8 y 2°C, mientras que a temperaturas superiores la enzima pierde bruscamente su capacidad de unión con el substrato, comportamiento que guarda una estrecha relación con la temperatura del hábitat del pez (Baldwin y Hochachka, 1970).

Otras enzimas, como la acetilcolinesterasa de otras especies de peces, por ejemplo, Mugil cephalus (Baldwin y Hochachka, 1970), o la LDH₅ del pez abisal Antimora rostrata (Baldwin et al., 1975), se caracterizan por una dependencia lineal de la Km frente a la temperatura de medida en un amplio intervalo de esta última, relacionado generalmente con las temperaturas del hábitat del animal; además, la pendiente de la respuesta Km-temperatura de estas enzimas

no suele ser muy pronunciada. En este caso, las enzimas son euritermas y muestran cierta independencia de la temperatura. Un caso particular es el observado en Rana pipiens, en el que la aclimatación a la temperatura induce un descenso en la Km para piruvato de la LDH muscular y un aumento en la inhibición por este sustrato sin alterar, aparentemente, el tipo de isoenzima (Enig et al., 1976).

-11.-Variantes múltiples.-

Otra alternativa es la síntesis de moléculas enzimáticas cualitativamente distintas, las cuales pueden ser mejores catalizadores a bajas temperaturas que las variantes enzimáticas presentes en los individuos aclimatados al calor. De acuerdo con esta hipótesis, el proceso de aclimatación se caracteriza por una reestructuración bioquímica mayor en el organismo, de manera que se producen las moléculas apropiadas en las cantidades apropiadas y en el tiempo apropiado para asegurar la función biológica frente a las condiciones ambientales fluctuantes (Hochachka y Somero, 1973; Somero, 1972; 1975).

1.-Variaciones cualitativas : En pocos casos está completamente claro que las temperaturas ambientales bajas induzcan la síntesis de isoenzimas que no estén presentes en el estado de aclimatación al calor, o lo estén en pequeñas cantidades. Esta síntesis inducida de isoenzimas específicas en un límite térmico bien definido se ha descrito en la acetilcolinesterasa del cerebro de trucha (Baldwin y Hochachka, 1970), pensándose que estos cambios tienen un origen adaptativo (Moon, 1975).

2.-Variaciones cuantitativas: Por otro lado, gran cantidad de autores no han encontrado cambios específicos en el modelo electroforético de algunos sistemas isoenzimáticos. Así, el modelo de LDH de ce

rebro, branquias, intestino y músculo esquelético del pez Idus idus aclimatado a 10 y 20°C no ofrece cambios, pero si se detectó inducción específica de isoenzimas en el hígado (Künnemann, 1973). No hay cambios significativos en el modelo de isoenzimas de LDH del músculo cardiaco de tortugas durante la exposición prolongada al frío o la inmersión forzada prolongada (Beall y Privitera, 1971). En otros trabajos tampoco se han detectado cambios de este tipo en este mismo sistema enzimático en peces aclimatados al frío (Wilson et al., 1975; Shaklee et al., 1977). Muchas evidencias indican que los cambios isoenzimáticos descritos en la LDH del hígado y músculo de ciprino (Hochachka, 1965; 1966) se deben a un polimorfismo genético mejor que a una variación fenotípica inducida por el ambiente, puesto que parece que no hay alteraciones consistentes en el modelo de isoenzimas inducidas por la temperatura (Wilson et al., 1973; 1975), aunque otros autores (Tsukuda, 1975) si encuentran cambios cuantitativos con la aclimatación al frío, aumentando la actividad relativa de LDH₄ y LDH₅ del hígado. En Xenopus laevis se han descrito también cambios en este sentido (Tsugawa, 1976). Posiblemente, la discordancia de datos se deba a la falta de cuantificación eficaz de las isoenzimas presentes en todas las condiciones térmicas, a las diferencias inter-específicas, a la duración del período de aclimatación y a los cambios cíclicos de los animales.

-b.-Alteraciones secundarias.-

Las respuestas primarias provocadas por la aclimatación a la temperatura en el control de la cantidad o el tipo de ciertas enzimas llave de las rutas biosintéticas o productoras de energía podrían alterar, a su vez, el microambiente celular, de manera que resulte afectada la eficacia de otros procesos catalíticos que no estén bajo el control directo del ambiente (Hazel y Prosser, 1974).

-i.-Composición lipídica de las membranas.-

Los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los lípidos se pueden reflejar en la función de las membranas, siendo el efecto más evidente el de la permeabilidad (Chang y Matson, 1972; Haest et al., 1969). Los sistemas de membranas pueden ser necesarios también para la función catalítica proporcionando una matriz apropiada para muchos sistemas de enzimas. - Por ejemplo, se ha demostrado que las enzimas de la cadena de transporte de electrones necesitan los componentes lipídicos de las membranas para su actividad (Fleischer et al., 1972). Además, muchas enzimas unidas a membranas muestran un requerimiento parcial u obligatorio de ácidos grasos insaturados (Hazel y - Prosser, 1974). Las alteraciones inducidas por el ambiente en la estructura de la membrana no solo mantienen una fluidez apropiada en esta, sino que también pueden modular la actividad de las enzimas, unidas a ella, durante la aclimatación térmica. Así, estudios sobre la succínico deshidrogenasa del músculo epaxial de ciprino han indicado que el aumento en la actividad específica de esta enzima después de un periodo de aclimatación al frío, se puede explicar parcial o totalmente por los cambios subyacentes en la composición lipídica de la membrana mitocondrial interna - que regulan la actividad, en lugar de cambios en la cantidad de esta enzima (Hazel, 1972).

-ii.-Ambiente intracelular.-

Las concentraciones de Mg^{2+} y Ca^{2+} parecen ser más sensibles a la temperatura que las concentraciones de iones monovalentes, y estos iones funcio--nan como cofactores de muchas enzimas reguladoras. Sin embargo, no hay datos que correlacionen los cambios iónicos con la actividad enzimática (Hazel y - Prosser, 1974).

Otra posibilidad es que los cambios induci--

dos por la temperatura en las concentraciones de metabolitos y cofactores pudieran estar también implicados en la regulación de la función catalítica, tanto por medio de interacciones alostéricas como directamente, alterando el alcance de la saturación enzimática. Se han descrito cambios importantes en las concentraciones de intermediarios glucolíticos y de nucleótidos de adenina en el músculo de ciprino después de la aclimatación térmica (Freed, 1971). El posible significado regulador de estos cambios no está claro todavía.

-C.-Compensación térmica evolutiva.-

-a.-Cinética enzimática.-

Se ha sugerido que, en los poiquiloterms adaptados al frío, la selección natural podría haber favorecido a las enzimas capaces de bajar la energía de activación (E_a) de una reacción determinada; en los sistemas donde se dispone de una energía térmica limitada, las enzimas que sean muy efectivas en la reducción de estas barreras de energía podrían ser una ventaja (Somero, 1969). De acuerdo con esta hipótesis, las enzimas glucolíticas, entre ellas la LDH, y del ciclo de las pentosas de un lenguado y un cangrejo del mar de Bering, se caracterizan por tener unos valores de E_a muy bajos (Behrsh, 1972). Aunque este tipo de correlación exista en algunas enzimas, no es universal (Hochachka y Somero, 1971). Sin embargo, E_a es una medida de la entalpía de activación en lugar de medida de la energía libre de activación (ΔG^\ddagger) y se ignoran los posibles cambios en la entropía de activación que podrían hacer importantes contribuciones a la ΔG^\ddagger , la cual, a su vez, determina la velocidad de reacción. Las comparaciones de los números de renovación (turnover) para la LDH₅ de conejo, pollo, atún y mero, han indicado que la enzima de los organismos ectotermos es considerablemente más eficaz - que la de mamíferos (Low et al., 1973) por tener va-

lores más bajos de entalpía y entropía de activación (Low y Somero, 1974). Se ha sugerido también que la selección natural podría haber favorecido a las energías de activación mínimas (números máximos de renovación) en el intervalo de temperaturas de función catalítica normal en cada especie animal (Raison et al., 1971). En otros trabajos, se ha encontrado cierto grado de correlación entre la ΔG^\ddagger de la LDH₅ de 6 vertebrados y la temperatura corporal junto con la capacidad de glucolisis anaerobia del músculo (Baldwin, 1975). Por otro lado, se ha sugerido que las magnitudes de dos tipos de entalpías, la de ionización y la de la combinación del piruvato con el complejo LDH₅-NADH no ionizado, podrían ser importantes en la evolución de las LDH y de otras enzimas en los poiquilothermos (Wilson, 1977).

La adaptación evolutiva de las enzimas a la temperatura ha conducido también a la selección de valores de Km mínimos a temperaturas coincidentes con las del hábitat. Así, en el caso de la LDH de Trematomus, la Km mínima para piruvato se observa a 0°C, mientras que la de un pez pulmonado que vive en un hábitat de 30°C, se observa a 30-34°C, mostrando la trucha valores de Km mínimos a temperaturas intermedias (Somero, 1969). La adaptación evolutiva, sin embargo, no tiene un efecto consistente en los valores absolutos de Km, ya que los valores bajos de esta no predominan en el frío. Por ejemplo, los valores de la Km de LDH de Trematomus son consistentemente mayores que los de la enzima de un pez pulmonado tropical. Así, se ha sugerido que los valores absolutos de la Km estarían seleccionados de tal forma que permitirían que la tasa de catálisis variase óptimamente en respuesta a cambios en las concentraciones fisiológicas de sustrato en lugar de originar tasas de catálisis compensadas térmicamente (Hochachka y Somero, 1973; Somero, 1969).

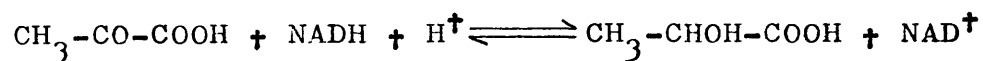
-b.-Estructura primaria de las proteínas.-

Algunas propiedades catalíticas y estructurales de las proteínas, tales como las temperaturas óptimas, las de desnaturalización térmica, especificidad de sustrato, eficacia catalítica y la dependencia térmica de las constantes cinéticas (por ejemplo, K_m), dependen de la estructura primaria, determinada genéticamente, de la proteína en cuestión. En términos de termostabilidad, los organismos que han vivido en ambientes fríos durante generaciones pueden haber experimentado mutaciones en el sentido de que algunas de sus proteínas se hayan vuelto relativamente lábiles frente al calor; estas mutaciones no serían letales, a menos que el organismo no se haya transpasado a un ambiente cálido. Por eso no es raro que las variaciones en la función protéica asociadas a la adaptación a un ambiente térmico particular, se correlacionen con diferencias determinadas genéticamente en la composición y secuencia de aminoácidos. Así, parece que la presencia de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, junto con los aminoácidos que los facilitan, así como otros, tales como la prolina y la hidroxiprolina, proporcionan a las proteínas un cierto grado de termostabilidad (Hazel y Prosser, 1974).

-III.-LACTATO DESHIDROGENASA.-

Gran parte del conocimiento concerniente al proceso evolutivo que aumenta el número de genes que codifican una enzima, al control genético y al desarrollo de la síntesis enzimática, a la estructura de las subunidades de las enzimas, al papel de las formas múltiples de las enzimas en la regulación del metabolismo, a las interacciones enzima-ligando, a los mecanismos moleculares de la reacción enzimática, etcetera, ha sido impulsado por los estudios sobre el sistema enzimático de la lactato deshidrogenasa (LDH-E.C. 1.1.1.27; L-lactato: NAD oxidorreductasa). Esta enzima se encuentra en la mayoría de las células de -

los vertebrados y funciona en la interconversión catalítica del piruvato y el lactato, en presencia de las coenzimas NADH y NAD⁺:



con un $\Delta G^\circ = -6,0$ Kcal/mol, con lo que el equilibrio global de la reacción está fuertemente desplazado hacia la derecha.

-1.-Multiplicidad de la LDH.-

La multiplicidad de esta enzima fué observada primero en preparaciones purificadas de corazón de buey (Meister, 1950; Neidlands, 1952) y también en extractos celulares crudos o en plasma sanguíneo (Vessel y Bearn, 1957; Wieland y Pfleiderer, 1957). Posteriormente, mediante análisis electroforéticos y cinéticos, se demostró que había formas distintas de la enzima en el músculo esquelético y en el cardíaco de mamíferos (Pfleiderer y Jeckel, 1957; Kaplan et al. 1960; Kaplan y Ciotti, 1961) y las variaciones existentes en la distribución de las isoenzimas de LDH en las distintas especies de vertebrados (Haupt y Giersberg, 1958; Wieland et al. 1959) y en los diferentes tejidos de una misma especie (Markert y Möller, 1959).

-A.-Bases moleculares de la multiplicidad.-

Desde muy temprano se estableció la estructura tetramérica de la LDH, observándose que los polipéptidos de una mezcla de isoenzimas se podían resolver electroforéticamente en dos tipos, llamados M (A) y H (B) (Apella y Markert, 1961; Markert, 1962). Entonces, se propuso que la base molecular de la multiplicidad de las cinco isoenzimas de LDH comunmente observadas en mamíferos, consistía en la combinación al azar de las subunidades H y M en todas las estructuras tetraméricas posibles. Mediante técnicas de hibridación molecular e immunoquímicas (Markert, 1963; Cahn et al. 1962; Markert y Ursprung, 1962; Lindsay, 1963;

Fondy et al. 1964; Wachsmuth et al. 1964) se establece la composición de subunidades de la forma siguiente: LDH₁ (H₄), LDH₂ (H₃M), LDH₃ (H₂M₂), LDH₄ (HM₃) y LDH₅ (M₄). Las formas primordiales LDH-H₄ y LDH-M₄ se han purificado en una gran variedad de vertebrados, comprobándose que difieren en su composición de aminoácidos y en sus propiedades immunoquímicas, así como cinéticas (Markert y Apella, 1963; Kaplan y White, -- 1963; Wilson et al. 1964; Pesce et al. 1967; Holmes y Scopes, 1974).

-B.-Multiplicidad genética de LDH.-

-a.-Isoenzimas LDH₅ y LDH₁.-

Las propiedades químicas e immunoquímicas diferentes de LDH₁ y LDH₅ pueden demostrar que están codificadas por loci genéticos separados. La primera confirmación genética de este hecho se obtuvo de la observación de un alelo mutante del locus H de ratón de campo (Shaw y Barto, 1963), el cual resultó -- ser hereditario como un solo gen autosómico codominante. Estudios sobre ligamiento, utilizando técnicas de hibridación de células somáticas, demostraron que los loci H y M no están ligados (Ruddle et al. 1970). Se ha confirmado la estructura de las subunidades y la -- distribución genética de LDH₁ y LDH₅ en muchos otros vertebrados mediante análisis genéticos, utilizando variantes alélicas de estas isoenzimas: peces -- (Markert y Faulhaber, 1965; Odense et al. 1966; Morrison y Wrigth, 1966; Ohno et al. 1968; Bailey y Wilson, 1968; Whitt, 1969, 1970; Lush, 1970; Markert et al. -- 1975); anfibios (Wrigth y Moyer, 1968; Sherr, 1968; -- Salthe, 1969, 1975; Guttman, 1975); reptiles (Neaves y Gerald, 1969); aves (Zinkham et al. 1966) y otros -- mamíferos (Manwell y Kerst, 1966; Syner y Goodman, -- 1966).

-b.-Isoenzima LDH-C₄ de mamíferos y aves.-

Se ha encontrado una isoenzima de LDH adicio-

nal en el testículo maduro de muchas especies de aves y mamíferos, llamada en principio LDH-X (Blanco y Zinkham, 1963; Goldberg, 1963). Esta enzima tiene una estructura tetramérica (LDH-C₄), y está codificada por un locus génico distinto de los loci H y M (Zinkham et al. 1963; 1964; Blanco et al. 1964; Goldberg, 1965) que funciona solo en los espermatozoides (Blanco et al. 1964; Goldberg y Hawtrey, 1967). Se ha demostrado, mediante estudios sobre ligamiento, que los loci H y C de la LDH de paloma están localizados en el mismo cromosoma y muy cercanos (Zinkham et al. 1969).

-c.-Isoenzima LDH-E₄ de peces teleósteos.-

Los análisis electroforéticos de las isoenzimas de LDH de varios tejidos de peces teleósteos, indican la presencia de un locus genético adicional (Markert y Faulhaber, 1965; Nakano y Whiteley, 1965; Odense et al. 1966; Whitt, 1969, 1970; Markert y Holmes, 1969; Lush et al. 1969; Markert et al. 1975). Se ha establecido la existencia de este locus E (C) utilizando variantes electroforéticas de LDH (Whitt et al. 1971; Vrijenhoek, 1972) y se ha visto que funciona predominantemente en regiones del sistema nervioso relacionadas con la visión (Whitt y Booth, 1970) o en el hígado (Utter y Hogins, 1969; Lush, 1970; Sensenbaur y Kaplan, 1972; Shaklee et al. 1973). Se ha visto que este locus se activa diferencialmente durante la ontogenia.

-d.-Subunidades H' y M' de salmónidos.-

Algunos peces, principalmente los salmónidos, muestran modelos electroforéticos de LDH muy complejos, con unas 15 isoenzimas en individuos homocigóticos (Morrison y Wrigth, 1966; Goldberg, 1966; Hochachka, 1966; Ohno et al. 1968; Massaro y Markert, 1968; Bailey y Wilson, 1968; Holmes y Markert, 1969). Estudios genéticos posteriores han demostrado que la LDH de trucha está determinada por, al menos, cinco loci

génicos (Morrison y Wright, 1966; Morrison, 1970). - Pruebas bioquímicas y citológicas han puesto de manifiesto que los salmónidos son tetraploides (Ohno et al. 1968; Klose et al. 1968). De acuerdo con esto, - las múltiples formas isoenzimáticas de LDH de estos peces, reflejarían una duplicación y posterior divergencia evolutiva de los loci H y M. Esta propuesta se apoyó en estudios bioquímicos y de hibridación molecular (Massaro y Markert, 1968; Bailey y Wilson, 1968; Holmes y Markert, 1969), los cuales verificaron la -- existencia de locus duplicados M: M y M', y H: H y H'; además del locus E de estos peces. Por tanto, los zimogramas complejos de los salmónidos se explicarían de la siguiente forma: 1º) cinco isoenzimas de LDH que - contienen las subunidades M y M'; 2º) otras cinco con las subunidades H y H'; 3º) la isoenzima E₄, y 4º) -- las isoenzimas híbridas que contienen las subunidades H, H' y E.

-C.-La multiplicidad de LDH y el fenómeno epigenético.
-a.-Reducción del número de isoenzimas.-

Muchos peces y anfibios muestran una multiplicidad de la LDH reducida, la cual no va asociada a la existencia de menos loci génicos, sino a un fallo de la hibridación entre las subunidades H y M in vivo para formar las cinco isoenzimas posibles. Ciertas LDH de teleósteos, por ejemplo, tienen restringidas las - posibilidades de asociación in vivo e in vitro de sus subunidades H y M, de manera que solo se forman dos - (H₄ y M₄) o tres (H₄, H₂M₂ y M₄) isoenzimas (Markert y Faulhaber, 1965; Markert, 1968; Markert y Holmes, - 1969; Whitt, 1970). La ausencia de heteropolímeros y la existencia de modelos no binomiales de distribución de la actividad entre las isoenzimas se debe o - bien a la inestabilidad de las isoenzimas híbridas o a la incapacidad de las subunidades H y M para asociarse (Markert, 1967; 1968; Shaklee, 1973). Algo similar ocurre en los anfibios, así, las ranas del género Ra-

na contienen cuatro isoenzimas en sus tejidos (Salthe et al. 1965; Wrigth y Moyer, 1968; Moyer et al. 1968; Alonso, 1973; De Costa et al. 1978), posiblemente las 1, 3, 4 y 5, excepto R. esculenta, según hemos podido comprobar en nuestro laboratorio; mientras que el tritón (Triturus viridescens), exhibe solamente las dos isoenzimas homotetraméricas, LDH-M₄ y LDH-H₄ (Sherr, 1968).

-b.-Multiplicidad epigenética.-

Inversamente, se ha observado una multiplicidad de la LDH que es el resultado de la modificación epigenética de las subunidades H y M, la cual no se debe a loci génicos adicionales que codifiquen cadenas polipeptídicas distintas. En el sistema LDH de ratón, por ejemplo, las isoenzimas que poseen subunidades M se resuelven en sub-bandas (Costello y Kaplan, 1963; Fritz y Jacobsen, 1965), las cuales son específicas de tejidos y se modifican durante el desarrollo (Koen, 1967). Esta multiplicidad se ha explicado en términos de la unión covalente de glutatión reducido o cisteína a las subunidades M de la LDH mediante puentes disulfuro (Dudman, 1969; Dudman y Zerner, 1969; 1973; Markert y Holmes, 1969).

-2.-Propiedades generales de las isoenzimas de LDH.-

Todas las isoenzimas genéticas de LDH de vertebrados estudiadas hasta ahora son tetrámeros con un peso molecular de 140.000±10.000 y su distribución se resume, en rasgos generales, en la siguiente tabla:

<u>Isoenzimas homotetraméricas de LDH de vertebrados</u>		
<u>Isoenzima</u>	<u>Otras denominaciones</u>	<u>Localización pral.</u>
LDH-M ₄	LDH ₅ , LDH muscular, LDH-A ₄	Músculo esquelético.
LDH-M ['] ₄	LDH-A ['] ₄	Músculo esquelético de salmónidos.
LDH-H ₄	LDH ₁ , LDH cardiaca,	Músculo cardiaco.

<u>Isoenzima</u>	<u>Otras denominaciones</u>	<u>Localización pral.</u>
LDH-H ₄	LDH-B ₄	Músculo cardíaco.
LDH-H' ₄	LDH-B' ₄	Hígado y músculo cardíaco de peces salmónidos.
LDH-C ₄	LDH-X, LDH seminal, LDH-X ₄	Semen de aves y mamíferos.
LDH-E ₄	LDH-E, LDH ocular, LDH hepática, LDH-C ₄	Retina, sistema nervioso e hígado de teleósteos.

(Masters y Holmes, 1975).		

-A.-Estructura y composición de aminoácidos.-

Aunque todavía no está completamente definida la secuencia de aminoácidos de las subunidades H y M, los datos disponibles sobre la composición de aminoácidos y secuencias parciales sirven para ilustrar su homología. No obstante, se ha podido determinar el 80% de la secuencia de aminoácidos de la LDH₅ de lija (Taylor et al. 1973; Adams et al. 1970), observándose que esta subunidad, la M, tiene dos mitades separadas por un espacio, con tres cadenas conectoras; -- con la excepción del residuo 20 amino terminal, la -- subunidad es globular, con cerca de un 20% de los residuos en conformación hélice α , y un 10-15% con una estructura de lámina plegada o β . Los residuos cisteina esenciales del centro activo y el centro de unión con la porción de nicotinamida de la coenzima están -- localizados en el espacio que hay entre las dos mitades.

Un tipo de composición de aminoácidos de las LDH₁, LDH₅ y -C₄ se resume a continuación. Posible-- mente, las diferencias estén en el número de residuos de treonina, glicocola y leucina elevado, y los pocos residuos de metionina e isoleucina de la LDH-C₄, y en

los bajos niveles de residuos aspartato de la LDH ₅ .
 Por lo demás, sus composiciones de aminoácidos son --
 muy semejantes entre sí, con más similitudes entre --
 los polipéptidos H y C, que entre los C y M (Goldberg,
 1972). Las LDH C₄ y 5 de mamíferos muestran unas pro-
 piedades similares con respecto a la inactivación por
 calor y la urea, siendo más estables que la LDH ₅ . -
 Las LDH ₁ y E₄ de teleósteos son muy homólogas respec-
 to a sus especificidades immunoquímicas y a sus pro--
 piedades de labilidad. Los anticuerpos antiH y antiE
 reaccionan rápidamente con estas isoenzimas homotetra-
 méricas, pero no con la LDH ₅ , en muchos peces, lo -
 cual indica una gran semejanza de secuencias.

Propiedades fisicoquímicas de	LDH 5	LDH 1	C ₄
Estabilidad en calor (ratón) (t 1/2 min a 65°C)	5	30	40
Reactividad immunoquímica			
Antisuero antiM (buey)	+++	---	---
Antisuero antiC (ratón)	---	---	+++
Composición de aminoácidos (M/H: rata; C: ratón)			
lisina	111	96	104
histidina	25	28	32
arginina	41	33	41
aspartato	127	149	155
glutamato	114	111	108
treonina	46	57	80
serina	95	102	108
prolina	47	45	48
glicocola	97	92	144
alanina	71	81	83
valina	141	144	139
metionina	27	34	13
isoleucina	90	87	74
leucina	140	138	179
tirosina	28	26	25
fenilalanina	28	22	23
Secuencia de aminoácidos del péptido cisteina esen- cial de LDH 5 y 1 del cerdo:			
-Val-Ileu-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg-			
Secuencia de aminoácidos carboxilo terminales de la LDH de cerdo:			
5	-Glu-Leu-Glu-Phe		
1	-Leu-Lys-Asp-Leu		

(Masters y Holmes, 1974; 1975).

En trabajos realizados en nuestro laboratorio, hemos podido comprobar que el orden de isoenzima más estable al calor a la más labil en el sistema LDH del anfibio anuro Discoglossus pictus es LDH-1, 3, 5, 4 y 2, necesitándose una temperatura de 60°C para poder detectar algo de inactivación al cabo de una hora; -- mientras que en Rana ridibunda, el orden de isoenzima más estable a la más labil es LDH-5, 4, 3 y 1, bastan do con subir a 40°C para empezar a detectar inactiva- ción.

-B.-Propiedades cinéticas.-

Un aspecto general, basándose en algunas enzi mas de mamíferos, de las propiedades cinéticas de las isoenzimas de LDH se expresa en la siguiente tabla.

Propiedades cinéticas de	LDH 5	LDH 1	C4
Km en mM (hombre)			
lactato	18	2,9	25
piruvato	0,83	0,08	0,05
NAD	0,29	0,5	0,109
2-oxobutirato	10	0,84	0,18
Km en mM (buey)			
lactato	14	5	33
piruvato	0,15	0,05	0,08
Km en mM (ratón)			
lactato	3,92	2,34	2,25
piruvato	0,345	0,09	0,042
NAD	0,237	0,164	0,048
NADH	0,036	0,008	0,013
pH óptimo (hombre)			
oxidación de lactato	9,75	10,75	8,75-9,0
reducción de piruvato	7,25	8,0	7,5
Especificidad de análogo de coenzima (hombre)			
nucleótido de acetil piridina/NAD:	0,32	0,9	1,17
Números de renovación (moles NADH oxid./mol enzima/min)			
reducción de piruvato (buey)	80000	49400	5000

(Masters y Holmes, 1974, 1975; Hawtrey et al. 1975).

Evidentemente, las cifras varían de una espe- cie a otra, pero se mantiene una cierta constancia en la relación entre ellas.

-C.-Distribución tisular y función fisiológica.-

Se ha encontrado comunmente, en la distribución de las isoenzimas de LDH en los tejidos, que el contenido de subunidades M parece estar relacionado con el metabolismo anaerobio. Los músculos esqueléticos de la mayoría de los vertebrados contienen LDH ₅, mientras que tejidos con un metabolismo aerobio, como el corazón y el cerebro (sobre todo en vertebrados superiores), con un suministro relativamente asegurado de oxígeno, contienen principalmente LDH ₁ (Masters y Holmes, 1974). Además, las aves migratorias y las especies activas de murciélagos, tienen mayor actividad de la subunidad H en sus músculos de vuelo que los animales menos activos pero relacionados filogenéticamente (Wilson et al. 1963; Valdiviesco et al. 1968). Por otro lado, las fibras musculares rojas tienen mayor cantidad de subunidades H que las fibras musculares blancas. Estas distribuciones son paralelas al requerimiento de una mayor glucólisis aerobia para la contracción muscular continuada. En contraste, los animales adaptados a condiciones de hipoxia (animales hibernantes y buceadores) poseen mayores niveles de subunidades M en sus corazones y cerebros (Lind y Rajasalmi, 1966; Burlington y Sampson, 1968; Altman y Robin, 1969; Blix y From, 1971).

Estas distribuciones se han razonado, en términos fisiológicos, considerando el papel de la LDH en la regulación de la relación NAD^+/NADH , y la influencia que esta proporción tiene sobre una serie de reacciones celulares. Durante el metabolismo de la glucosa en el músculo cardíaco, no se acumula NADH, puesto que este es oxidado rápidamente por la respiración mitocondrial, la cual también utiliza piruvato para la producción de energía. La LDH ₁, que tiene una mayor afinidad por el lactato que la enzima muscular, probablemente intervenga en la oxidación del lactato sanguíneo, formando piruvato que entraría también en la

mitocondria. En el músculo esquelético de contracción rápida e intensa, la producción de piruvato a partir de glucosa aumenta durante el ejercicio, y el NAD se convierte en NADH. En ausencia de oxígeno, este NADH se oxida a NAD mediante la LDH₅, de baja afinidad, pero eficaz en estas condiciones, y el lactato se acumula en el tejido, difundiendo eventualmente hacia el torrente sanguíneo. Esta teoría, denominada "aerobia-anaerobia", se basa en que LDH₁ se inhibe en presencia de concentraciones altas, pero fisiológicas, de piruvato, a las que LDH₅ no se inhibe.

Queda un cierto número de distribuciones isoenzimáticas de LDH que no se ajustan a las predicciones de la teoría "aerobia-anaerobia": 1) la composición isoenzimática de LDH de los embriones iniciales de mamíferos no varía en proporción directa al grado de tensión de oxígeno (Masters y Holmes, 1972); 2) el lenguado (Pleuronectiformes) contiene predominantemente LDH₅ en los tejidos cardíaco y muscular, aunque estos animales tengan un gen H funcional y no difieren, en términos de ambiente, apreciablemente de otras especies de peces con LDH₁ como forma predominante en el corazón (Markert y Holmes, 1969; Lush et al. -- 1969; Gesser y Poupa, 1973); 3) la alta proporción de LDH₅ que posee el hígado de la mayoría de los mamíferos y otras especies de vertebrados, a pesar de que el metabolismo de las células hepáticas es, en principio, aerobio (Masters y Holmes, 1974). A esta distribución se la ha querido encontrar una relación con -- los hábitos carnívoros (Ogihara, 1975) y con la capacidad de huida o ataque mediante la carrera (Everse y Kaplan, 1975). 4) Algunas células, que mantienen una función aerobia-anaerobia semejante en las distintas especies (ej: los eritrocitos), muestran amplias divergencias filogenéticas en sus modelos isoenzimáticos (Masters y Holmes, 1975).

-a.-Función fisiológica de la isoenzima LDH₁ .-

Algunos autores (Vesell, 1975) ponen en cuestión la teoría "aerobia-anaerobia", basándose en las excepciones de la regla expuestas anteriormente y en otras observaciones, tales como que las experiencias de inhibición de LDH₁ por piruvato y lactato no se han realizado en condiciones fisiológicas ni de temperatura (25°C) ni de concentración de enzima. Si las experiencias se realizan a 37-40°C y a concentraciones fisiológicas de enzima, el efecto inhibitor de las concentraciones altas fisiológicas de ambos substratos se reduce bastante. Estos autores justifican la presencia de las isoenzimas en función de la degradación diferencial de estas en los distintos tipos de células y porque la carga eléctrica diferente que caracteriza a cada isoenzima, las capacita para la unión diferencial a las estructuras celulares, unión que sería ventajosa para la función de una determinada isoenzima en un orgánulo celular determinado.

Otros autores (Everse y Kaplan, 1975) definen la teoría "aerobia-anaerobia" en principio porque a concentraciones fisiológicas de LDH₁ sí se da este efecto inhibitor de los substratos. Basándose en la concentración de metabolitos del tejido muscular cardiaco, deducen que la formación del complejo ternario que inhibe a la LDH₁, integrado por enolpiruvato, NAD⁺ y la enzima, es posible, lo cual resulta favorable para la célula cardiaca, puesto que el piruvato y el NADH formados al final de la glucólisis entran en la mitocondria, donde son oxidados. Así, estando la LDH₁ inhibida, el piruvato ingresa en el ciclo de Krebs. El NADH que se forma en el citoplasma tiene tres rutas principales posibles para la reoxidación: 1) la reducción de piruvato con formación de lactato; 2) la transformación de oxalacetato en malato, pasando este último a la mitocondria, donde es metabolizado en el ciclo de Krebs; 3) la formación de -

α -glicérofosfato a partir de dihidroxiacetona fosfato, el cual pasaría al metabolismo de los lípidos. Estando inhibida la LDH₁, el primer camino está cerrado, con lo que se utilizarían los otros dos restantes.

Para la formación del complejo ternario es necesaria la presencia en la célula, al parecer, del enolpiruvato, compuesto que se forma por tautomerización del cetopiruvato, siendo este último el sustrato de la LDH. Parece ser que esta tautomerización ocurre normalmente en la célula, a pesar de que el proceso in vitro es muy lento, con una frecuencia relativa y de forma no enzimática, sin saberse a ciencia cierta por qué (Everse y Kaplan, 1975). Una vez formado el complejo ternario, conviene saber en que condiciones se desarrolla la disociación. Al parecer, la presencia de lactato provoca la disociación rápida de este complejo, y la presencia de NADH también, pero de una forma mucho más lenta. Sabido esto, cabe esperar que la presencia de lactato en la célula cardiaca, sobrepasando un cierto umbral, desinhibiría a la LDH, con lo cual, este lactato se transformaría en piruvato, que ingresaría en el ciclo de Krebs. Este lactato podría proceder de la circulación sanguínea mejor que de la propia célula cardiaca. La producción de NADH en cantidades superiores a las normales en la célula cardiaca, a consecuencia de una disminución en la tensión de oxígeno, también supondría una desinhibición de la LDH₁, aunque en menor cantidad que en presencia de lactato, provocando la reducción de piruvato y la acumulación de lactato, en pequeñas cantidades en el propio tejido y en niveles mayores en el resto del animal (por ejemplo, en sangre o linfa), en condiciones de hipoxia. La producción de NADH tendría que ser lo suficientemente alta como para saturar a la malato deshidrogenasa que, como se ha visto, compite con la LDH por dicha coenzima.

La formación del complejo ternario se debe, -- al parecer, a la estructura primaria del sitio activo de la enzima, que es el mismo en todas las isoenzimas, con lo que ocurriría en todas ellas, solo con las diferencias de las afinidades de las enzimas por el enolpiruvato y el NAD^+ (Everse y Kaplan, 1973). La importancia de este complejo in vivo se ha discutido (Bailey y Lim, 1977).

-b.-Función fisiológica de la isoenzima LDH-M4.-

Con respecto a la LDH₅, se ha observado que, en el músculo esquelético de varias especies, esta isoenzima existe como forma libre y como forma unida a las membranas, de manera que las propiedades fisicoquímicas de estas dos formas difieren marcadamente, así como que el piruvato inhibe con mayor facilidad a la forma libre que a la unida (Hultin et al. 1966; -- Melnick y Hultin, 1968; Hultin et al. 1972; Ehmann y Hultin, 1973; Melnick y Hultin, 1973). Estas diferencias cinéticas pueden ser la base de una función metabólica reguladora que convierta a LDH₅ unida en libre en el músculo esquelético. De acuerdo con esta hipótesis, en el músculo esquelético, durante el ejercicio, la concentración de NADH subiría y la LDH unida a la membrana, en principio inactiva, se solubilizaría y se activaría debido a su capacidad para reoxidar el NADH en presencia de un aceptor de electrones apropiado. Este mecanismo podría ayudar a mantener -- las tasas de glucolisis bajo condiciones anaerobias, y, además, minimizaría la competición por los electrones entre la LDH y la mitocondria en condiciones aerobias, cuando gran parte de la LDH₅ está unida.

Aunque la función fisiológica de las otras -- tres isoenzimas híbridas no ha sido estudiada con detalle, es de suponer que esté situada en un intermedio de LDH₁ y LDH₅.

-c.-Función fisiológica de la isoenzima LDH-C4.-

Una propiedad distintiva de esta isoenzima en

comparación con los otros dos homotetrámeros es su ineficacia catalítica. El número de "turnover" de LDH-C4 es solo 1/10 del de la isoenzima 1 y 20 veces menor que el de la 5. Como resultado, se ha sugerido que esta ineficacia serviría para evitar la producción de grandes cantidades de lactato en el espermatozoide y, por lo tanto, la inhibición de la movilidad y la capacidad funcional de este (Goldberg, 1972). Otros autores han observado que la LDH-C4 humana utiliza el α -cetobutirato como sustrato mejor que los otros dos homotetrámeros, teniendo una Km para este ácido menor que la exhibida por las otras dos isoenzimas (Svasti y Viriyachai, 1975). Por otro lado, observan que la Km para piruvato es menor también en LDH-C4, aunque esta misma constante para el lactato sea intermedia entre LDH₅ y LDH₁, y para el NAD^+ sea también menor.

En ratón se ha podido observar que las Km para lactato, piruvato y NAD^+ son más bajas en LDH-C4 que en los otros dos homotetrámeros, mientras que la de NADH es intermedia. En vista de estos datos, se ha propuesto un modelo que consiste en que el ambiente de la trompa de falopio contiene cantidades significativas de lactato; debido a la alta afinidad de LDH-C4 por este sustrato, esta enzima produciría energía convirtiendo el lactato, formado posiblemente en la célula de la mucosa de la trompa mediante la LDH₅ y liberado al lumen de la propia trompa, en piruvato mediante la conversión de NAD^+ en NADH. La baja afinidad relativa de la LDH-C4 por el NADH podría hacer que la coenzima reducida entrara en el sistema de transporte de electrones para producir ATP. La continuidad de la operación exige que la mitocondria utilice el NADH y que este llegue fácilmente a aquella, y que la LDH-C4 tenga acceso al NAD^+ y al lactato (Hawtrey et al. 1975).

-d.-Función fisiológica de la isoenzima LDH-E4.-

La distribución predominante de la LDH-E₄ en las células fotorreceptoras de teleósteos condujo a proponer que la enzima desempeña un papel esencial en la regeneración de la rodopsina (Whitt, 1970). En contraste con otros vertebrados, el NAD⁺ es la coenzima utilizada por la retinol deshidrogenasa de los teleósteos, y estos peces podrían necesitar entonces una LDH específica para regular los niveles de NAD⁺. La LDH-E₄ podría estar capacitada para este papel, puesto que tiene alta afinidad por el piruvato y sería eficaz en la conversión de NADH en NAD⁺. La distribución específica de LDH-E₄ en los hígados de los peces gadoideos podría ser una consecuencia de los altos niveles de grasas característicos de estos animales, ya que esta isoenzima es más estable en ambientes hidrofóbicos -- que los otros homotetrámeros de LDH .

-3.-Filogenia y evolución de la LDH.-

-A.-Relaciones filogenéticas de las isoenzimas de LDH.-

-a.-Estructura.-

Se han purificado isoenzimas de LDH a partir de una gran variedad de vertebrados y se ha demostrado que las especies muy relacionadas tienen estructuras de composición similar de aminoácidos (Wilson et al. 1964; Pesce et al. 1967). El contenido de histidina de la LDH₅ es variable con la especie; las aves tienen un alto contenido comparado con el de los anfibios, siendo los reptiles intermedios al respecto. Esta información está de acuerdo con los conceptos evolutivos aceptados. Muchos de los aminoácidos de las LDH₁ examinadas varían también significativamente: el contenido de isoleucina en mamíferos es mayor que en aves y anuros, y el contenido de arginina de anfibios es menor que el de aves y mamíferos.

-b.-Cinética.-

Los estudios cinéticos comparados de LDH₁ , utilizando análogos de coenzimas, han apoyado general

mente las conclusiones de que cuanto más relacionadas son las especies, más similares son las LDH, y estos cambios sutiles en las propiedades cinéticas se presentan como continuos durante la evolución (Kaplan et al. 1960; Wilson et al. 1964).

-c.-Immunoquímica.-

Los estudios immunoquímicos se han utilizado con éxito en las comparaciones filogenéticas. El orden decreciente de la intensidad de reacción de antiLDH--1 de pollo con las distintas LDH₁ está de acuerdo con las relaciones filogenéticas conocidas: aves, reptiles, anfibios, teleósteos y condriactios (Wilson et al. 1964). Se observan resultados similares cuando se utiliza antiLDH₅ de mero para comparar las homologías immunoquímicas de una serie de LDH₅ de peces y LDH de otros vertebrados.

-d.-Distribución relativa.-

La comparación de la distribución relativa de las subunidades H y M se ha utilizado también en estudios filogenéticos. Por ejemplo, se ha investigado la composición de isoenzimas de LDH de los eritrocitos de roedores (Baur y Pattie, 1968; Jacobsen et al. 1969; Shows et al. 1969; Shows y Ruddle, 1968; 1968b; Engel, 1972).

También se ha demostrado un cambio hacia hacia la predominancia de la subunidad H durante la evolución del cerebro (Syner y Goodman, 1969).

-e.-Movilidad electroforética.-

La electroforesis se ha aplicado con limitaciones en los estudios filogenéticos. Normalmente, las movilidades electroforéticas son muy variables, incluso entre especies muy relacionadas, un comportamiento que hace que esta propiedad tenga un valor limitado en los estudios taxonómicos. Hay, sin embargo, muchos grupos de animales para los que una de las isoenzimas

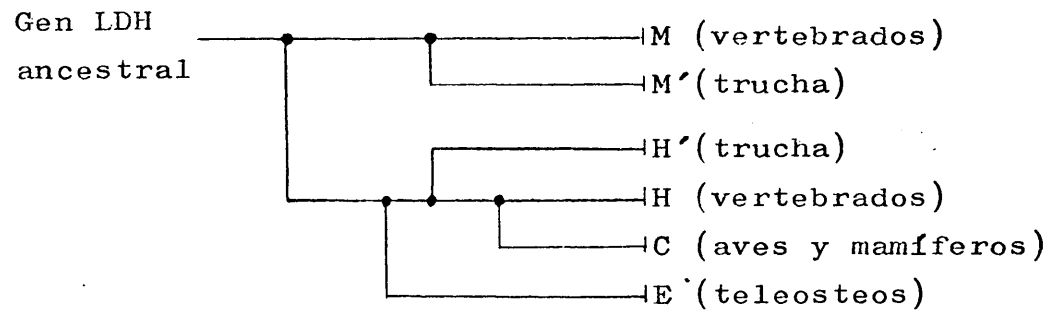
de LDH exhibe una variabilidad electroforética conservativa. Por ejemplo, se ha utilizado la variabilidad polimórfica de la isoenzima LDH₁ en el análisis de varias poblaciones de dos especies del género Rana, R. pipiens y R. palustris, del continente norteamericano; la distribución geográfica de 11 formas variantes de esta enzima, está generalmente en concordancia con la distribución de los lugares de puesta, con los resultados de los estudios de hibridación y con la distribución de las subespecies. (Salthe, 1969).

La existencia de la función génica C y E en vertebrados también tiene un significado filogenético, puesto que estos genes son activos en grupos de animales muy relacionados. La LDH-C₄ se ha observado en una amplia variedad de mamíferos euterios (Zinkham, 1968), marsupiales (Holmes, 1972; Holmes et al. 1973; Baldwin y Temple-Smith, 1973) y en paloma (Zinkham, 1968). La función génica de LDH-E₄ de las células retinales parece estar restringida a su distribución en teleósteos, estando ausente en peces primitivos como los agnatos y los condrictios, así como en los teleósteos relativamente primitivos como los cipriniformes, anguiliformes y Clupeidae (Whitt y Horowitz, 1970; Horowitz y Whitt, 1972). La LDH-E₄ se encuentra solo en los peces de las familias Cyprinidae y Gadidae, y su distribución, consecuentemente, está muy limitada (Klose et al. 1969; Odense et al. 1969; Lush, 1970; Sensabaugh y Kaplan, 1972; Shaklee et al. 1973).

-B.-Evolución de los genes de la LDH.-

A pesar de que no se dispone de las homologías de los distintos polipéptidos de LDH a nivel de la comparación de sus secuencias de aminoácidos, los estudios immunoquímicos, químicos y de hibridación han permitido el establecimiento de algunas teorías acerca del origen evolutivo de los múltiples genes de la LDH (Holmes y Markert, 1969; Whitt, 1970; Holmes,

Una propuesta de la evolución de los genes de LDH se resume en el siguiente esquema, en el que los círculos negros representan los acontecimientos de - duplicación génica (Holmes y Scopes, 1974).



El origen del gen LDH-C es probablemente el - locus génico H, puesto que están ligeramente ligados en paloma (Zinkham et al. 1969), y los polipéptidos H y C poseen cierto grado de reactividad immunoquímica en algunos animales (Holmes, 1972; Holmes y Scopes, 1974). El gen LDH-E posiblemente tenga su origen en una duplicación del gen H (Whitt, 1969; Markert y Holmes, 1969; Holmes y Markert, 1969; Whitt, 1970) durante la evolución en tiempos cercanos a la radiación evolutiva de los teleosteos (Horowitz y Whitt, 1972). Las LDH-E4 y 1. son muy homólogas en términos de sus propiedades immunoquímicas, cinéticas y físicas, y, seguramente, en un alto porcentaje de sus secuencias de aminoácidos.

Así, parece que el mecanismo de establecimiento de los genes múltiples de LDH en vertebrados es - similar al encontrado en hemoglobinas. Un locus primordial de la enzima se ha duplicado y divergido en su secuencia de aminoácidos tanto que se ha provisto de una diversidad molecular suficiente para los complejos requerimientos metabólicos de los organismos superiores. En un contexto amplio, las homologías en las secuencias del centro activo y las similitudes -

en el tamaño de las subunidades indican que todas -- las deshidrogenasas dependientes del NAD^+ , o ligadas a esta coenzima, en vertebrados, probablemente -- hayan evolucionado a partir de un locus génico ancestral común (Taylor et al. 1973).

-4.-Isoenzimas de LDH y ontogenia.-

-A.-Perfil histórico.-

El sistema LDH se ha revelado como un parámetro extremadamente sensible de la diferenciación a nivel molecular. La especificidad ontogénica de los modelos isoenzimáticos fué puntualizada primero por Markert y Möller (1959). Más adelante, muchos de los primeros investigadores, estudian, en el desarrollo de aves, las propiedades immunoquímicas y electroforéticas de LDH en tejidos individuales (Cahn et al. 1962; Lindsay, 1963). Así, en el músculo de pollo durante el desarrollo, el músculo relacionado con el vuelo, la actividad LDH está presente como la isoenzima más anódica (LDH_1 o LDH-H₄) en el embrión inicial, se distribuye entre las cinco formas de actividad durante la maduración, y en el adulto está predominantemente concentrada en la forma más catódica -- (LDH_5 o LDH-M₄). Otros tejidos adultos difieren marcadamente en sus modelos de actividad isoenzimática. El corazón mantiene la mayoría de su actividad en la LDH_1 y LDH_2 , mientras que el hígado adulto muestra un modelo intermedio.

En los primeros estudios detallados del desarrollo de la LDH de las especies de mamíferos, se ha mostrado que los polipéptidos de las formas embrionarias, por ejemplo de ratón, son casi todas del tipo M, y que los tejidos tales como el corazón, la concentración de la subunidad H crece rápidamente durante el periodo de gestación; otros tejidos también -- muestran un aumento de esta subunidad, pero de una forma individual (Markert y Ursprung, 1962). Así, --

las progresiones del desarrollo de isoenzimas de estas dos especies son unidireccionales, pero procediendo con el sesgo ontogénico opuesto, de H a M en pollo y de M a H en ratón. Se publicaron observaciones de naturaleza similar en la rata y en otras especies de mamíferos (Fine et al. 1963). Este comportamiento parece, además, estar relacionado con la condición relativamente más aerobia de los embriones de aves respecto a los de mamíferos (Nakano y Whiteley, 1965). Otras observaciones, con la conclusión de que tanto los embriones como los cultivos tisulares pueden verse influidos por la tensión de oxígeno, el cual podría regular la síntesis diferencial de las subunidades de LDH (Goodfriend et al. 1966), apoyaron también esta teoría.

De manera que estas primeras investigaciones condujeron a tres conclusiones: a) la forma embrionaria inicial de esta enzima es un tipo parental (LDH-H₄ o LDH-M₄) en todos los vertebrados; b) que el tipo de subunidad LDH sintetizada en los tejidos adultos o embrionarios se regula específicamente por el grado de oxigenación del tejido; y c) que el control de la síntesis de LDH es análogo al de la hemoglobina (Markert, 1963; Fine et al. 1963).

Más adelante, se ha podido comprobar que la LDH embrionaria de las especies de vertebrados no son necesariamente parentales, según estudios sobre el desarrollo de especies de rumiantes (Hinks y Masters, 1964; Fieldhouse y Masters, 1966); así, el análisis de la LDH del embrión inicial de diferentes especies de mamíferos recorre toda la gama de las contribuciones del tipo H y del M. Los datos comparados de las situaciones de las isoenzimas del adulto y del embrión, se interpretan más apropiadamente como indicadores de una acción indirecta del oxígeno sobre la síntesis de LDH. Así, los embriones ovinos están substancialmente menos oxigenados que los de conejo

y ligeramente menos que los humanos, pero la enzima de los embriones iniciales de oveja posee menos actividad de tipo M que los de conejo y más que los humanos. La falta de relación proporcional entre estos parámetros en el embrión favorece la conclusión de que el oxígeno ejerce un efecto indirecto en el control epigenético de la biosíntesis de LDH en los mamíferos.

Además, los datos sobre las progresiones embrionarias de la LDH clarifica que el control genético de esta enzima no es tan análogo al de la hemoglobina. Las características de la biosíntesis de LDH durante la ontogenia (polipéptidos H y M), son consistentes con la existencia de dos genes estructurales distintos presentes en diferentes operones, cada uno de los cuales estaría influido independientemente por los factores directivos (Fieldhouse y Masters, 1966; Hinks y Masters, 1966; Masters y Holmes, 1975).

-B.-Actividades de LDH durante la organogénesis.-

Los cambios en los tipos de actividad de la enzima (como distinción de los cambios en el modelo) pueden estar correlacionados con los cambios fisiológicos que tienen lugar durante la organogénesis. La causa de estos cambios de actividad es, a menudo, compleja; se puede incluir factores tales como la inducción o estabilización por substrato, cambios en el desarrollo de la función tisular y del tipo de células, fuentes de nutrientes alteradas, efectos hormonales y la influencia de factores ambientales como la temperatura.

-a.-Músculo.-

El cambio más llamativo de la actividad específica del desarrollo de la LDH de vertebrados es el aumento substancial postnatal que ocurre en el músculo esquelético. Puesto que el modelo isoenzimático típico del músculo esquelético de mamíferos adultos

posee una predominancia de LDH₅, este rápido aumento se puede interpretar como una des-represión de la -- síntesis de las subunidades tipo M, sobrecompensada considerablemente por alguna alteración en la producción del tipo H, lo que daría un ejemplo tangible de la regulación independiente de los genes LDH in vivo. El "disparador" de este gran aumento no ha sido identificado, pensandose que estará relacionado con la adaptación del tejido a su función fisiológica característica, esto es, la adquisición de la contractilidad muscular y su utilización en el movimiento del animal (Masters y Holmes, 1975). Cambios similares en la actividad relativa de las isoenzimas de LDH se -- han observado en el músculo de la pata de Discoglo--ssus pictus, un anfibio anuro, cuyo modelo va evolu--cionando, durante la metamorfosis y la juventud, desde un 37,26% de subunidades H hasta el 17% del animal adulto (Alonso et al. 1976).

-b.-Corazón.-

Se ha indicado que el corazón es un tejido de maduración temprana, por la secuencia de la activi--dad específica, lo cual está de acuerdo con la fun--ción activa de este órgano en los estados medios ini--ciales del desarrollo. No hay en el tejido cardiaco una síntesis rápida de subunidades M; en su lugar, -- hay un aumento gradual de la actividad tipo H para -- dar al final el modelo del adulto, en el cual, la actividad tipo H es característicamente predominante -- (Masters y Holmes, 1975).

-c.-Diafragma.-

El diafragma presenta también un cambio inte--resante durante el desarrollo, de manera que aumen--tan los dos tipos de actividad después del nacimien--to, dando un modelo resultante que no es binomial. -- Se ha sugerido que estas diferencias de modelos gene--rados al azar se expliquen, posiblemente, asumiendo

que son mezclas de diferentes tipos celulares, puesto de manifiesto por las evidencias histológicas que dan cuenta de dos tipos de fibras musculares distintos. El marcado cambio de la función de este tejido al nacer tiene su origen, al parecer, en una des-represión de la síntesis del tipo M en el músculo de contracción rápida, y un aumento coincidente de la síntesis de subunidades H en las fibras de contracción rítmica (Masters y Holmes, 1975).

-d.-Otros tejidos.-

Otros tejidos, como el riñón, el hígado, el cerebro, el pulmón, el intestino (Masters y Holmes, 1975) y la piel (Alonso et al. 1976), muestran en general cambios poco marcados en los niveles de actividad total y relativa durante el desarrollo. En realidad, presentan una aproximación gradual a los modelos característicos del animal adulto. En la piel de anfibios se ha visto un descenso del porcentaje de subunidades H durante la metamorfosis (Alonso et al. 1976), y en las distintas regiones del cerebro de rata, un descenso en el porcentaje de LDH₄ paralelo a la diferenciación prenatal y postnatal, y, por lo tanto, a la disminución del número de mitosis celulares (Gonzalez de Buitrago, 1976).

-C.-Actividad LDH en los estados iniciales del desarrollo.-

Muchos de los datos sobre activación génica en los primeros estados del desarrollo se han obtenido de estudios sobre vertebrados inferiores, principalmente anfibios, y en algunos invertebrados como los equinodermos (Alonso y Torrellas, 1973; Faulhaber y Lyra, 1975; Claycomb y Villee, 1971). Estos trabajos ponen de manifiesto, por otro lado, la no existencia de modelos parentales de isoenzimas al inicio del desarrollo. Así, en Discoglossus pictus, partiendo de un modelo inicial con un porcentaje de

subunidades H y M semejante, se llega a un predomi--
nio de LDH₁ en los primeros estados de la premetamor--
fosis (Alonso y Torrellas, 1973). En estas especies,
el desarrollo inicial tiene lugar, según se ha podi--
do observar, sin la participación del genoma embrio--
nario; así, el proceso parece estar gobernado por --
las sustancias acumuladas en el vitelo del huevo. -
En vista del hecho de que el embrión de mamíferos, -
debido a su desarrollo interno, tiene menos material
de reserva que el de los vertebrados inferiores, se
puede decir que el genoma embrionario podría iniciar
la transcripción en estados anteriores a los no mamífe--
ros (Masters y Holmes, 1975).

El nivel inicial de actividad LDH en el óvulo
de ratón resulta extraordinariamente alto (Brinster,
1965; 1967; 1967b; Rapola y Koskimies, 1967; Epstein
et al. 1969; Wolf y Engel, 1972), descendiendo hasta
un 12% del nivel inicial en el estado de blastocisto
medio (4 días), y a menos de un 1% de la actividad o--
riginal justo antes de la implantación. También se -
observó un cambio extremo en el tipo de LDH asociado
a este cambio de actividad: hay solo LDH₁ en los es--
tados iniciales, hasta la implantación, y después de
esta solo se observa LDH₅ (Auerbach y Brinster, 1967).
Este cambio brusco parece que no es el modelo general
de desarrollo de las isoenzimas de LDH en los prime--
ros estados del desarrollo de mamíferos (Brinster, -
1968; Engel y Kreutz, 1973; Engel y Petzoldt, 1973).

-5.-Degradación de la LDH.-

Hay un consenso general de opinión sobre que
la degradación se debe a la presencia de enzimas pro--
teolíticas en los tejidos. Se ha descrito que hay --
tres grupos de enzimas que inactivan específicamente
las enzimas-piridoxal, las enzimas dependientes del
NAD⁺ y las enzimas-FAD, según sus respectivas apopro--
teínas (Kutunuma, 1973). Estas enzimas actuarían co--

mo iniciadores de la degradación enzimática en la célula y los productos de esta acción hidrolítica serían degradados posteriormente en aminoácidos por las proteasas lisosómicas, u otras, no específicas. Además, la tasa de proteólisis de estos sistemas enzimáticos y de los sistemas degradantes específicos, se vería marcadamente afectada por la concentración de inhibidores asociados, de coenzimas y de substratos, y por las influencias dietéticas, hormonales y de factores ambientales, sobre todo en poiquilotermos, en el caso de la temperatura (Masters y Holmes, 1975).

-A.-Renovación de las isoenzimas.-

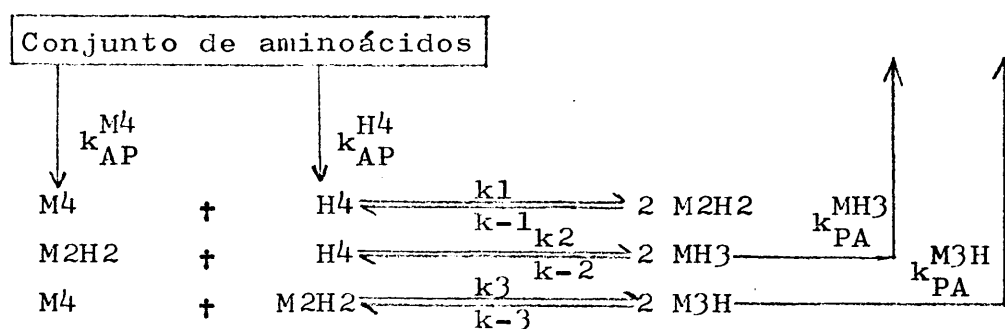
Se han calculado las constantes de síntesis y degradación de algunas isoenzimas de LDH en diversos tejidos de rata, cuyos resultados se esquematizan a continuación (Fritz et al. 1969; 1971; 1973).

Isoenzima y tejido.	Composición de subunidades	Síntesis (pmoles/día/ gramo)	Degrada- ción (día ⁻¹)
Músculo cardíaco			
LDH-1	H ₄	98,2	0,042
LDH-5	M ₄	12,4	0,316
Músculo esquelético			
LDH-1	H ₄	5,8	0,112
LDH-5	M ₄	8,6	0,006
Hígado			
LDH-5	M ₄	74,8	0,047

Es evidente que hay diferencias en la tasa de renovación de las isoenzimas individuales entre los tejidos. La LDH₅ se sintetiza 30 veces más rápidamente en el hígado que en el músculo cardíaco, mientras que la constante de degradación es 10 veces más rápida en el músculo cardíaco que en el hígado. Por otro lado, en el músculo esquelético, las constantes de degradación de las isoenzimas individuales aumentan

en progresión casi logarítmica de LDH_5 a LDH_1 ; pero el modelo de renovación de isoenzimas es muy distinto en otros tejidos. Estos resultados, confirman que la síntesis y la degradación son importantes para determinar los niveles de isoenzimas y que la relación entre síntesis y degradación es muy específica de tejido. Esta marcada divergencia en las tasas de degradación de las isoenzimas de un tejido a otro, apoya también la posibilidad de que algunos sistemas isoenzimáticos hayan podido surgir de la necesidad de mantener una actividad particular de cara a las tasas de degradación rápidas de ciertos tipos de células (Masters y Holmes, 1975).

También se ha puntualizado que, en el caso de una proteína multimérica como la LDH, la interacción de las subunidades podría desarrollar un papel importante en el control de la concentración de proteínas en las células animales (Fritz et al. 1971). Se han presentado evidencias en apoyo de un modelo que considera una regulación por fenómenos post-traduccion: el modelo, esquematizado a continuación, podría proporcionar una explicación de cómo las concentraciones de proteína pueden cambiar en la célula mientras las tasas de transcripción y traducción permanecen constantes.



(Todas las k_{AP} son de orden cero; las k_{PA} son de orden uno y las restantes k de orden dos).

De manera que se ha incorporado el requerimiento de rutas específicas de síntesis y degradación.

ción, implicando solo a ciertas isoenzimas; pero la selección de esta secuencia particular no está aún justificada del todo.

-B.-Degradación y ontogenia.-

Si las tasas de degradación son bajas en los tejidos en crecimiento rápido, como parece ocurrir - en las fases de crecimiento de los microorganismos - (Jacob y Monod, 1961), se puede asumir que la síntesis es el factor predominante. Por otro lado, si es cierto que las constantes de síntesis y degradación no cambian durante la vida del animal (Fritz et al. 1971), entonces los cambios en las concentraciones - enzimáticas durante el desarrollo podrían estar enteramente determinados por estas constantes, y simplemente representan la aproximación al estado estacionario desde un nivel inicial de enzima(s).

La cantidad limitada de datos experimentales existentes parece apoyar la primera de estas alternativas como la más probable. Los datos del desarrollo postnatal de la LDH de rata de que se dispone, - muestran que la degradación crece desde valores bajos inmediatamente después del nacimiento hasta alcanzar un equilibrio con la síntesis en un periodo - de 100 días (Fritz et al. 1974; 1975).

Tampoco son muy frecuentes los estudios sobre los efectos de la edad en las isoenzimas de LDH. Se ha observado una pérdida de actividad en la LDH₅ del músculo de ratón, que se atribuye a un decrecimiento en el número total de moléculas plenamente activas y no a la presencia de un número creciente de moléculas parcialmente inactivas (Oliveira y Pfuderer, -- 1973).

-6.-Hormonas e isoenzimas de LDH.-

Una dimensión adicional de la expresión de la actividad enzimática es la de la mediación hormonal.

La amplitud de las influencias de las hormonas en la regulación del metabolismo está bien definida, aunque los mecanismos de acción no estén aún totalmente explicados.

Se ha mostrado que la inyección de estradiol en ratas hembra inmaduras produce un aumento en el contenido de enzima tipo M en el útero (Dawson et al. 1964; Goodfriend y Kaplan, 1964). Por otro lado, se ha demostrado que los modelos de LDH en los tejidos y fluidos reproductores de conejos adultos se ven muy afectados por distintos tratamientos hormonales (Georgiev et al. 1970; Patterson y Masters, 1972), de forma que el tratamiento con progesterona, testosterona y estradiol induce un marcado aumento en la actividad específica de LDH de las secreciones del oviducto, cambiando su modelo de isoenzimas de un tipo intermedio a otro con un ligero aumento en las subunidades M. Además, se ha observado que la insulina provoca en el hígado de conejo un aumento de las subunidades M, mientras que se ve el efecto contrario en el tejido adiposo; el efecto de la preñez sobre estas isoenzimas es similar al que provoca la insulina (Acebal et al. 1974).

En anfibios urodelos se ha observado que la tiroxina provoca la aparición de LDH₃ en los hemáticos y de LDH₃ y LDH₄ en el plasma en larvas metamorfoseadas de Ambystoma mexicanum a los 4 meses de edad por influencia de esta hormona, cuando estos cambios suceden en las larvas sin metamorfosear a la edad de 7 meses, correspondiendo a los modelos de isoenzimas del animal adulto (Ouedraogo y Chalumeau-Le Foulgoc, 1973). Esto traduce la influencia de esta hormona sobre las formas multimoleculares de la LDH.

-7.-Microlocalización de las isoenzimas de LDH.-

Aunque la LDH es una enzima localizada en la

fracción soluble de las células, las características de carga de sus isoenzimas influyen indudablemente - en la localización celular in vivo. Parece inevitable que las moléculas proteicas de una célula ocupen posiciones que reflejen en parte una interacción complementaria con otros elementos cargados (Masters y Holmes, 1975).

-A.-LDH₁ .-

Se han aportado evidencias de una localización preferente de la LDH₁ en la mitocondria (Agostini et al. 1966), y, aunque esta posición tuviera - un sentido fisiológico debido a las características cinéticas particulares de esta isoenzima, la realidad de esta asociación con el orgánulo no está aún - muy clara y parece ser un artefacto (Masters y Holmes, 1975).

-B.-LDH₅ .-

Por otro lado, se ha encontrado que la LDH₅ se une con facilidad a la materia particulada del - músculo esquelético, mientras que la LDH₁ lo hace con dificultad en una gran variedad de condiciones - (Ehman y Hultin, 1973). Además, se ha observado más de un 73% de inhibición por el piruvato en la enzima soluble, con concentraciones altas de sustrato, - mientras que no hay inhibición detectable en la enzima unida; también se elimina casi totalmente la inhibición por NAD⁺ en la enzima unida. Este comportamiento parece estar de acuerdo con la sugerencia según la cual, para que se forme el complejo ternario que provoca la inhibición de la LDH, tiene que haber una disociación previa de las subunidades (Griffin y Criddle, 1970); arguyéndose también que la asociación con las partículas puede preservar la integridad del tetrámero de la enzima, previniendo, así, la formación del complejo ternario inactivo. Sobre el posible papel fisiológico de este comportamiento de la -

-8.-Cambios en las isoenzimas de LDH relacionados con procesos patológicos.-

-A.-Cambios en los tejidos.-

-a.-Tumores.-

Se ha demostrado un cambio de LDH₁ a LDH₅ en un gran número de tipos de tumores (Goldman et al. 1964). En muchos casos, se puede detectar un incremento absoluto de subunidades M. Estos cambios se han justificado en función de la teoría "aerobio-anaerobio", basándose en que los tumores de crecimiento rápido parecen tener un metabolismo glucolítico anaerobio. También se ha aceptado que las células cancerosas son no especializadas o indiferenciadas, lo que hace que este cambio sea considerado como una regresión a un modelo de isoenzimas "embrionario" o "fetal" (Schweitzer et al. 1973). Por otro lado, parece ser que la presencia de grandes cantidades de LDH₄ está relacionada con el estado indiferenciado de las células, y, por lo tanto, con la permanencia de la capacidad mitótica (Gonzalez de Buitrago, 1976).

-b.-Alteraciones miógenas.-

Durante el desarrollo normal, la LDH del músculo pectoral de pollo muestra una transición de LDH₁ a LDH₅. Este cambio secuencial normal no ocurre en el músculo distrófico. El modelo se aproxima, así, al tipo "fetal" (Dawson y Kaplan, 1965). Se ha sugerido que el cambio de modelo es el resultado de un fallo del tejido dañado en la síntesis de suficiente número de subunidades M, de una degradación acelerada de este tipo de isoenzima en el tejido o de la pérdida preferente de esta del tejido. No se ha podido demostrar una correlación entre los cambios isoenzimáticos y el estado clínico de muchas disfunciones musculares (Kowalewsky y Rotthauwe, 1972), quizá porque la situación se complique por la presen

cia de macrófagos y fibroblastos en los tejidos en--
fermos, puesto que estas células podrían tender a --
cambiar el modelo en dirección "fetal".

-B.-Cambios en el suero.-

El análisis de las isoenzimas de LDH en suero se ha vuelto un método normal en la diagnosis de varias enfermedades. Generalmente, la lesión de un tejido va asociada con la liberación de sus LDH al suero, y puesto que la actividad LDH es varias veces mayor en casi todos los tejidos de mamíferos que en el suero, la lesión de una pequeña porción de tejido se reflejará en grandes elevaciones en la actividad LDH del suero, reflejando el modelo de isoenzimas de este el del tejido dañado (Vesell, 1975).

-a.-Aumento de la actividad LDH₁ .-

Cuando se produce una lesión en músculo cardiaco como resultado de la oclusión de una arteria coronaria, la liberación de LDH₁ , isoenzima predominante en el corazón, se refleja en una elevación diferencial de esta isoenzima en el suero; si el músculo dañado sana, la LDH₁ del suero vuelve a sus niveles normales. La persistencia de un modelo de isoenzimas con una LDH₁ anormalmente alta, puede -- ser un signo de residuos de la lesión cardiaca (Ve-- sell, 1975).

En enfermedades hematológicas, tales como la anemia perniciosa y varias anemias hemolíticas, la - rotura de los eritrocitos provoca un aumento de LDH₁ y LDH₂ en el modelo del suero, debido a que son las isoenzimas predominantes en estas células (Starkwea- ther et al. 1965). También, las lesiones renales producidas por la administración de cloruro de mercurio produce una elevación de LDH₁ y LDH₂ en el suero --- (Cornish et al. 1970).

-b.-Aumento de la actividad LDH₅ .-

En ciertas enfermedades del hígado, como la - hepatitis y la toxicidad por tetracloruro de carbono, en las que hay lesiones grandes en las células hepáticas, la liberación de la isoenzima predominante en este tejido, LDH₅ , se refleja rápidamente en un aumento de esta isoenzima en el suero (Wieme y Van --- Maercke, 1961). La elevación de esta isoenzima en el suero no es solo indicativa de una lesión hepática, puesto que las enfermedades del músculo esquelético, como la dermatomiositis, y los procesos tumorales, - producen elevaciones de LDH₅ y LDH₄ en el suero. Sin embargo, en la distrofia muscular de Duchenne, la -- LDH total del suero se eleva, pero la distribución - de esta actividad entre las cinco isoenzimas permanece normal (Dreyfus et al. 1962).

El cáncer humano, a lo largo de su desarrollo, es raro que se confine en un solo órgano; así, se -- producen metástasis en otros tejidos e incluso infecciones, infartos, anoxia y ayuno, los cuales pueden producir alteraciones aberrantes en el modelo de LDH del suero durante el desarrollo del cáncer, que no - reflejen un aumento en la LDH₅ . En ciertos tumores, este modelo de isoenzimas puede ser normal o mostrar isoenzimas adicionales (Starkweather y Schoch, 1962).

-9.-Variaciones de la LDH debidas a cambios en la temperatura ambiente.-

La influencia de los cambios en la temperatura ambiente, sobre todo los descensos, sobre las actividades LDH ha sido ampliamente estudiada tanto en homeotermos como en poiquilotermos.

-A.-Homeotermos.-

En muchos mamíferos, el descenso de la temperatura provoca la hibernación. Así, se han descrito aumentos en el porcentaje de las subunidades M en el

corazón y el cerebro, pero no en el hígado, de erizo con la hibernación (Olsson, 1975). También se ha observado una producción aumentada de la isoenzima LDH₅ en murciélagos con el torpor, posiblemente en función de un predominio del metabolismo anaerobio, ya que este efecto también se ha encontrado en condiciones de tensión de oxígeno baja (Hochachka, 1965; Lindy y Rajasalmi, 1966; Brush, 1968).

Se ha demostrado un descenso de la tasa LDH-H/LDH-M en ardillas durante la hibernación, observándose un aumento del porcentaje de subunidades M en el hígado, cerebro y corazón, siendo significativo solo en este último tejido (Burlington y Sampson, 1968). Si se miden a 32°C, la actividad total y la actividad de las subunidades M aumentan marcadamente en el hígado, corazón y cerebro de los animales en hibernación, mientras que si se miden a 15°C, no se observan diferencias aparentes en el cerebro y en el corazón, aunque en este último se siga detectando un aumento en la actividad M, pero sí en el hígado. Estos cambios se han explicado, en principio, por la disminución del oxígeno disponible en los tejidos y/o células de los animales en hibernación, los cuales presentan un aumento en el metabolismo anaerobio del músculo cardíaco, pero no en el del hígado, en cuyo caso se interpreta como un aumento en la utilización de lactato para la gluconeogénesis. El aumento de actividad total se relaciona con cambios conformacionales de la enzima como resultado de las fluctuaciones en los niveles de efectores (activadores e inhibidores) durante el ciclo de la hibernación, ya que se ha demostrado que en este período, la baja temperatura deprime la síntesis de proteínas.

Así que, en homeotermos, la hibernación parece provocar un aumento en la actividad LDH₅, dependiente posiblemente de la disminución de la tensión

de oxígeno.

-B.-Poiquilothermos.-

En el caso de los poiquilothermos, ya se han descrito anteriormente multitud de cambios metabólicos relacionados con los descensos de la temperatura ambiente. No obstante se van a esquematizar los relativos a la LDH.

-a.-Actividad específica.-

Se han descrito diversos tipos de cambios asociados a la aclimatación de poiquilothermos, en su mayoría peces, al frío, de forma que se han podido detectar: 1) aumentos, 2) mantenimiento y 3) descensos de la actividad específica.

1) Aumento: Se han descrito valores de la razón de actividad específica frío/calor de LDH (Hazel y Prosser, 1974) de 1,37 en el músculo de ciprino -- (Lehmann, 1970) aclimatado a 5 y 15°C; de 1,75 en el músculo del pez Idus idus aclimatado a 7 y 21°C (Künemann, 1970) y de 1,33 en músculo, hígado, branquias e intestino de este mismo pez aclimatado a 0,5 y 37°C (Lehmann, 1970b), lo cual es indicativo de compensación parcial.

2) Mantenimiento: No se han observado cambios en la actividad específica de LDH del músculo de ciprino aclimatado a 5, 15 y 25°C, aunque la media de los animales aclimatados a 5°C es menor que la de -- los de 25°C (Wilson et al. 1975), con lo que posiblemente no haya compensación. En el músculo, hígado, -- corazón y ojo del pez sol verde (Lepomis cyanellus), aclimatado a 5 y 25°C, tampoco se encuentran variaciones significativas (Shaklee et al. 1977).

3) Descenso: Por otro lado, no se ha observado compensación en la LDH muscular del pez Rhodeus a

marus aclimatado a 10 y 20°C, con una razón frío/calor de 0,98 (Braun et al. 1970); se ha observado un descenso en la actividad con la aclimatación al frío, esto es, compensación inversa, en la LDH muscular de L. cyanellus aclimatado a 5 y 25°C (Wilson, 1973), con una razón frío/calor de 0,62, seguramente confirmado por una disminución en la actividad de esta enzima paralela a la de la temperatura en el mismo tejido del mismo pez (Wilson et al. 1975) aclimatado a 5, 15 y 25°C. Por otro lado, se ha observado también compensación inversa, con una razón frío/calor de 0,70, en la LDH muscular del ciprino aclimatado a 5 y 25°C (Wilson, 1973). También se ha observado un descenso significativo en la actividad específica de cerebro de L. cyanellus (Shaklee et al. 1977).

Las diferencias observadas en la respuesta a la aclimatación de la actividad específica de LDH podría deberse a que esta respuesta sea específica de tejido (Shaklee et al. 1977) y a que el período de aclimatación varíe de una experiencia a otra y, en algún caso, esta no sea completa.

-b.-Distribución de isoenzimas.-

En pocos casos está completamente claro que las temperaturas ambientales bajas induzcan la síntesis de isoenzimas de LDH que no estuvieran presentes en el estado de aclimatación al calor, o presentes en pequeñas cantidades. Así, en el pez Idus idus aclimatado a 10 y 20°C se ha encontrado inducción de nuevas isoenzimas solo en el hígado (Künne mann, 1973).

Más abundantes son los casos en los que se observan variaciones en la distribución de isoenzimas, encontrándose resultados diversos que se pueden agrupar en: 1) aumento del contenido de subunidades H, relacionado con la mayor tensión de oxígeno del

medio a baja temperatura, en el caso de los poiquilo-
termos acuáticos; 2) mantenimiento cuantitativo o/y
cualitativo del modelo de isoenzimas; 3) aumento del
contenido de subunidades M, relacionado con una mayor
eficacia cinética de las isoenzimas que tienen una -
proporción más alta de esta subunidad frente a la ba-
ja temperatura.

1) Aumento del contenido de subunidades H:

La mayoría de estas observaciones se refieren a pe-
ces. Así, se ha apreciado una desaparición de las i-
soenzimas anódicas del hígado de ciprino al transfe-
rirle de 4-5 a 20-22°C, atribuible a una acción di-
recta de la temperatura ambiental elevada sobre la -
configuración de la proteína enzimática (Hochachka,
1965; 1966; 1967). Estas isoenzimas vuelven a apare-
cer cuando el proceso de aclimatación se completa -
(Tsukuda y Oshawa, 1974).

2) Mantenimiento del modelo de isoenzimas:

En este apartado también se pueden agrupar varias ex-
periencias realizadas en peces. Así, no se han obser-
vado diferencias cualitativas notables en el modelo
de isoenzimas de músculo y corazón de Gillichthys mi-
rabilis aclimatado a 8°C frente a los aclimatados a
28°C, pero sí en el hígado (Somero, 1973). En los te-
jidos de ciprino aclimatado durante cuatro semanas a
5, 15 y 25°C no se detectan cambios cualitativos ni
cuantitativos (Wilson et al. 1973; 1975), puntualizan-
do que los cambios observados en otras experiencias
con este mismo pez se deben a su polimorfismo genéti-
co. Tampoco se han encontrado variaciones en el mode-
lo de isoenzimas de diversos tejidos de Lepomis cya-
nellus aclimatado durante 4 semanas a 5, 15 y 25°C -
(Wilson et al. 1975) y a 5 y 25°C solo (Shaklee et
al. 1977). No se encuentran grandes variaciones en -
el complejo de 11 isoenzimas del hígado del pez Semo-
tilus antromaculatus causadas por la aclimatación a

5°C durante más de dos semanas, aunque si se encuentran debidas a la combinación de cambios en la temperatura y el fotoperíodo: desaparición de la isoenzima 10 en la adaptación a 5°C y 16h luz (L)-8h oscuridad (O) y la inversión en la intensidad de las isoenzimas 10 y 11 (las más catódicas) en los peces de 5°C y 8h L-16h O. Los resultados sugieren que la inducción de isoenzimas, como mecanismo molecular de compensación térmica, puede estar limitada a enzimas específicas de tejidos específicos, como el hígado, y que el fotoperíodo realiza un cierto papel en la compensación térmica a nivel molecular (Kent y Hart, 1976).

Se ha observado también en músculo esquelético de otro pez, Fundulus heteroclitus, que no hay variaciones en el modelo de isoenzimas con la aclimatación a 4°C durante 8 semanas, mientras que a 20 y 30 °C si se produce un aumento en las isoenzimas LDH₅ y LDH₄, a consecuencia posiblemente de un aumento en la glucólisis muscular (anaerobia) (Bolaffi y Booke, 1974).

No se han apreciado variaciones en los modelos de isoenzimas de músculo y corazón de Rana pipiens aclimatada durante 4 semanas a 4 y 25-28°C, aunque se encuentra un descenso en la Km para el piruvato en la LDH₅ muscular y un aumento de la inhibición por piruvato (Enig et al. 1976). Tampoco se ven cambios en el músculo cardiaco de tortuga (Beall y Privitera, 1971) con la exposición prolongada al frío.

3) Aumento del contenido de subunidades M:

Se ha demostrado, también, en hígado de ciprino aclimatado a 18 y 28°C durante dos meses, período después del cual se considera que el proceso de aclimatación es completo, un aumento significativo de la -

actividad relativa de LDH₅ y LDH₄ en la aclimatación a 18°C, siendo mayor este aumento si la actividad de este grupo de animales se mide a 18°C frente a la -- del grupo de 28°C medida a 38°C (Tsukuda, 1975), pensándose que, a baja temperatura, las condiciones son más favorables para el funcionamiento de LDH₅ y LDH₄. Las diferencias observadas frente a otras experiencias en hígado de ciprino posiblemente se deban a -- los distintos tiempos de aclimatación.

Por otro lado, se ha encontrado en hígado de Xenopus laevis una disminución significativa en la -- razón de las dos isoenzimas más anódicas a la más catódica en animales aclimatados a 14,5-15°C durante -- un mes frente a los aclimatados durante 24 días a -- 24,5-25,5°C, después de un período de 3 semanas a 19 °C. Se observaron cambios similares en cultivos in vitro de células de origen hepático y renal de esta especie, con un descenso de un 60% en las isoenzimas anódicas en el primer caso, y un descenso de un 50% en el segundo, cuando se exponen los cultivos a 8°C frente a otros expuestos a 24°C (Tsugawa, 1976), apareciendo en la aclimatación al frío de los cultivos una fuerte isoenzima anódica (LDH₁), posiblemente debido a la influencia de la mayor tensión de oxígeno. Se concluye que el cambio debido a la aclimatación al frío, no ha de ser una mera expresión de la presión parcial de oxígeno.

-OBJETIVOS.-

La bibliografía de que se dispone hasta el momento actual acerca de la influencia de la temperatura sobre los animales poiquilothermos, tanto a nivel global como a nivel molecular, está centrada sobre todo en los vertebrados acuáticos, como los peces. Así, la adaptación a la temperatura produce, en términos generales, una serie de alteraciones a todos los niveles, con un efecto compensador en la mayoría de los casos. A nivel del sistema lactato deshidrogenasa, enzima clave en la glucólisis, los resultados de la cuantificación de los cambios en la participación de cada una de las isoenzimas en el proceso de adaptación, resultan confusos.

Puesto que los anfibios anuros constituyen un grupo biológico que en su ontogenia presentan una vida acuática y en estado adulto, en la mayoría de los casos, una vida adaptada a las condiciones terrestres, nos ha parecido de extraordinario interés estudiar:

1º.- Efecto del frío ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) tanto en las larvas al estado 33 del desarrollo como en los animales adultos de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas, especie típicamente mediterránea, sobre la frecuencia cardíaca.

2º.- Variaciones en el consumo de oxígeno en larvas (estado 33 del desarrollo) de Discoglossus pictus pictus mantenidas a temperatura ambiente ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) y en animales adaptados a baja temperatura ($8 \pm 2^\circ\text{C}$), midiendo el consumo a 10, 20 y 25°C .

3º.- Las variaciones en la actividad específica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en

los tejidos de animales adultos y en las larvas completas (estado 33 del desarrollo) de Discoglossus pictus pictus adaptados a diferentes temperaturas.

4º.- Separar, mediante técnicas electroforéticas, y cuantificar (en %) las isoenzimas de LDH en los tejidos de animales adultos y en las larvas completas (estado 33 del desarrollo) de D. pictus pictus. Estudiar los posibles cambios en las actividades relativas de las isoenzimas en la adaptación a varias temperaturas.

5º.- Aportar algunos datos sobre las propiedades cinéticas de las isoenzimas de LDH de Discoglossus pictus pictus.

6º.- Habiendose observado en nuestro laboratorio variaciones en la velocidad electroforética de las isoenzimas de LDH de Discoglossus pictus pictus, estudiar la presencia de posibles variantes de la subunidad M y su control genético.

MATERIAL Y METODOS

-I.-MATERIALES.-

-1.-Productos.-

Aceite de columnas de CANALCO.

Acido acético de PROBUS.

Acido clorhídrico de MERCK.

Acrilamida de CANALCO.

Albúmina humana de laboratorios HUBBER.

Bisacrilamida (N,N'-metilendiocrilamida) de CANALCO.

Carbonato sódico de MERCK.

Dinucleótido de adenina y nicotinamida, forma oxidada (NAD^+), ácido libre, de MERCK.

β -Dinucleótido de adenina y nicotinamida, forma reducida ($\text{NADH} + \text{H}^+$), sal disódica, grado II, de BOEHRINGER.

Fosfato bipotásico de PROBUS.

Fosfato monopotásico de PROBUS.

Hidróxido potásico de MERCK.

Hidróxido sódico de MERCK.

Glicocola de CANALCO.

Gonadotropina coriónica humana (GCH), Pregnyl, de ORGANON.

D,L-lactato sódico, grado DL-V, de SIGMA.

Metosulfato de fenazina (PMS) de SIGMA.

Nitroazul de tetrazolio (NBT) de SERVA.

Persulfato amónico de SERVA.

Piruvato sódico, tipo II, de SIGMA.

Reactivo de Folin-Ciocalteu de PANREAC.

Sulfato de cobre de PROBUS.

Tartrato sódico-potásico de PROBUS.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina) de CANALCO.

TRIS (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) de CANALCO.

-2.-Aparatos.-

Centrífuga MSE.

Colorímetro Spectronic de BAUSCH & LOMB.

Cubetas de Electroforesis de Disco de SHANDON.

Densitómetro CHROMOSCAN de JOYCE-LOEBL.

Dinógrafo-Polígrafo RM de BECKMAN.

Espectrofotómetro BECKMAN DB-G, con inscriptor
VOM 5E de BAUSCH & LOMB.

Fuente de Alimentación para Electroforesis VoKam
SAE 2761 de SHANDON.

Respirómetro Barcroft-Warburg de B.BRAUN MELSUN-
GEN.

-3.-Animales de experimentación.-

Las experiencias se han realizado en Disco-
glossus pictus pictus Otth. (sapillo pintojo), va-
riedad a manchas, capturando los animales adultos -
en Madrid, en la zona denominada "Huerta del Obispo".
El género Discoglossus, encuadrado en la clase Anu-
ros, orden Euanuros y suborden Opistocelos, pertene-
ce a la familia de los Discoglósidos. Es de distri-
bución circunmediterránea muy irregular y está re-
presentado en toda el área por: D. pictus pictus, -
propia de la Península Ibérica (muy abundante en los
Pirineos Centrales), encontrándose también en Fran-
cia sudoccidental, Marruecos, Argelia, Túnez, Sici-
lia y Malta, presentando dos variedades: una a man-
chas y otra a bandas, siendo la primera un fenotipo
de caracteres dobles recesivos y la más abundante;
D. pictus sardus, propia de Córcega, Cerdeña, islas
Hyères y Montecristo; y D. nigriventer, oriundo de
Palestina (Salvat, 1968).

-A.-Animales adultos.-

Con una longitud máxima de 8 cm, los Disco-
glossus carecen de glándulas parótidas, presentan
disposición arcífera en su cintura pectoral, la pu-
pila es un triángulo esférico con un vértice hacia
abajo, poseyendo dientes vomerianos y lengua en for-
me de disco. Los machos tienen un uréter secundario,

independiente del canal de Wolf, que es púramente urinario y substituye parcialmente a dicho canal (- Grassé y Devillers, 1965). Son especies típicamente acuáticas, aunque D. pictus pictus, según se ha podido observar, parece semiacuática y no se aleja mucho de las zonas con agua en las que vive (Grassé y Devillers, 1965); frecuentan de modo preferente los estanques, fangales, pantanos y pozos incluso salobres, arroyos, manantiales, etc. Pasan la mayor parte del día en el agua, de la que únicamente salen - los días lluviosos, oscuros y sin viento y por poco tiempo. Cuando la temperatura desciende por debajo de los 9°C, se esconden en agujeros excavados bajo las piedras, en las orillas de los cursos de aagua o en las hendiduras de las rocas, donde pasan - el estío o invernan juntos varios individuos (Sal--vat, 1968). Se ha podido observar en D. pictus pic-tus que no sufren hibernación en sentido estricto, puesto que durante el invierno se han encontrado -- restos de comida en el estómago con cierta frecuencia; algo similar se ha observado durante la estivación, aunque la frecuencia de alimentación parece - mayor.

Se nutren de Culícidos, Dípteros, Coleópteros, Lepidópteros y son, a su vez, depredados por - Mamíferos, Aves y Ofidios (Natrix y Coluber). Sus - principales parásitos son Nematotaenia dispar (cestodo), Distomum ranae (tremátodo), Echinorhynchus - ranae (ácantocéfalo) y Cosmocerca ornata (nemátodo).

Viven desde el nivel del mar hasta los 2.250 m de altura. La hembra es más pequeña que el macho, del cual se distingue por tener los antebrazos me--nos robustos y por la ausencia de los grupos de pequeñas excrecencias de color negro que llevan los - machos sobre el tubérculo palmar interno, sobre los dos primeros dedos de la mano y sobre la barbilla.

Viven, en estado libre, unos 15 años. Cromosomas: $2n=28$; 20 metacéntricos y 8 acrocéntricos, en D. pictus pictus.

D. pictus pictus responde a la hormona gonadotropa coriónica humana (GCH) con maduración y puesta de huevos, así como con maduración y liberación de espermatozoides.

-a.-Elección y tratamiento de los animales adultos.-

Con el fin de reducir las variaciones debidas al tipo de variedad y al sexo, el grupo de experimentos con animales adultos se realizó con hembras de D. pictus pictus variedad a manchas, puesto que, además, esta variedad es la más abundante. Los pesos de los animales escogidos oscilaron alrededor de los 7 g, por considerarse este peso el del animal adulto de edad media.

-i.-Influencia experimental del frío ($8\pm 2^{\circ}\text{C}$), ayuno y fotoperíodo mínimo.-

Se capturaron 18 hembras a finales del mes de octubre. De estas, 8 se sacrificaron inmediatamente mediante desmedulación y se extrajeron el lóbulo central de hígado y el corazón y el cerebro enteros, procesándose según se verá más adelante. Las 10 hembras restantes se introdujeron en cámara fría, en unas cajas de plástico con la tapa perforada para el intercambio gaseoso, de unos 20 x 12 cm de base aproximadamente, en la que se ponían unos 250 ml de agua; cada una de estas cajas contenía a 5 hembras. La cámara fría se reguló para que el agua de las cajas de plástico tuviera $8\pm 2^{\circ}\text{C}$. Al cabo de los 5 meses, en el mes de abril, se sacrificaron estos animales por desmedulación y se extrajeron los tejidos como en el grupo anterior. Al grupo del mes de octubre se le denominó "Control" y al adaptado a $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, ayuno y obscuridad "Frío".

-ii.-Variaciones inducidas por la estación.-

Para comprobar la semejanza de los efectos del frío, ayuno y obscuridad con los producidos por la influencia del período invernal, en el que el ayuno y la obscuridad no son totales, se hicieron -- capturas en dos períodos del año:

-Invierno: Se capturaron hembras a mediados del mes de enero, tiempo en el que las temperaturas bajan -- en ocasiones de los 0°C durante la noche. Se sacrificaron inmediatamente y el proceso seguido fué similar al descrito para los animales anteriores. A -- este grupo de animales se les denominó "Invierno".

-Verano: Se capturaron hembras a principios del mes de julio, época en la que las temperaturas superan los 30°C durante el día. Se sacrificaron inmediatamente y se procesaron de manera análoga a los anteriores.

-B.-Desarrollo.-

En los Discoglossus, el amplexo es lumbar y dura menos de 2 min. El apareamiento suele realizarse unas tres veces al año, pero si la temperatura y el grado de humedad del lugar lo permiten, puede -- realizarse incluso cada mes. El macho toma, al final del invierno, sus características de amplexo, -- consistentes en la mayor nitidez de las excrecencias del tubérculo palmar interno, dos primeros dedos de la mano y de la barbilla. Toda la piel se queratiniza fuertemente, volviéndose rugosa y seca. Estas modificaciones se producen después de una muda particular, calificada de sexual. Una nueva muda después de la reproducción devuelve al tegumento a su estado anterior (Grassé y Devillers, 1965). Durante el amplexo, el macho emite una serie de chillidos que duran unos 20 seg. La hembra pone unos 300 huevos -- en cada puesta. Estos son completamente esféricos, con la excepción de una hendidura situada en el polo animal, que desaparece después de la fecundación,

en la que se acumulan los espermatozoides durante esta; tienen un diámetro que no supera los 2 mm y una vez en contacto con el agua, se hinchan con rapidez hasta alcanzar los 6 mm. Los huevos no se aglutinan entre sí, emitiéndose a intervalos, generalmente en grupos de 20-50 y caen al fondo. Son pardoscuros o verdeoscuros, con el tercio o cuarto inferior blanco o gris.

Los renacuajos (larvas), de una longitud -- máxima de 35 mm, tienen el espiráculo equidistante -- de los dos extremos del cuerpo. Al terminar la metamorfosis, los jóvenes miden 10 mm, alcanzan los 20 -- mm a finales del primer año, 30 mm al finalizar el -- segundo y a finales del tercero miden ya 50-60 mm. -- La madurez sexual está sujeta a las condiciones climáticas y suele alcanzarse al final del tercer año -- de vida (Salvat, 1968). Durante el desarrollo embrio-- nario, D. pictus no responde a la hormona de creci-- miento de los mamíferos (Alonso y Reyero, 1972).

-a.-Experimentos con el estado 33 del desarrollo.-

El estado 33 del desarrollo, según la des-- cripción de Manelli y Margaritora (1961) para Rana -- esculenta, se caracteriza en D. pictus pictus por te-- ner una longitud media de 20 mm, el hígado ya bien -- diferenciado con la vesícula biliar, así como el in-- testino, el cual ya es funcional (la alimentación co-- mienza en el estado 30-31). Las patas posteriores -- han iniciado ya su crecimiento y su tamaño es dos ve-- ces más largo que ancho.

La elección del estado 33 para estas expe-- riencias se ha hecho en función de que en este esta-- do, la tasa metabólica activa es más alta que en nin-- gún otro del desarrollo y porque es un estado inicial de la premetamorfosis, con la organogénesis avanzada, durante el cual no hay grandes cambios de desarrollo;

el animal se puede mantener durante dos meses en --
frío sin que pase de estado, al menos morfológicamente. Además, la larva es lo suficientemente grande para
hacer un extracto de cada individuo, como se verá
más adelante. Y, a diferencia del adulto y de esta--
dos posteriores, es exclusivamente acuática.

Las larvas al estado 33 se obtuvieron a partir
de las puestas de huevos inducidas en el laboratorio. Esta inducción se realiza inyectando 200 o --
400 unidades, según la época, de GCH, tanto a hembras
como a machos adultos de D. pictus pictus variedad a
manchas, en el saco linfático dorsal. Una vez inyectados
se separaron por parejas en cajas de plástico,
como las descritas en la adaptación al frío de hembras
adultas, con unos 300 ml de agua desclorada y a
unos 28°C. Si la inyección se ha realizado por la --
tarde, la puesta de huevos se produce por la noche.
Las fecundaciones se realizaron a partir de animales
de la variedad a manchas para evitar la posible hetero
geneidad ligada a este carácter. Se hace la separación
por parejas para poder controlar la homogenei--
dad de las puestas con respecto a la LDH₅, puesto --
que, como se verá más adelante, se ha observado la -
presencia de tres tipos de esta isoenzima referentes
a la velocidad electroforética: uno "lento", otro "inter
medio" y otro "rápido", al parecer de origen genético,
puesto que cada individuo muestra uno solo de
estos tipos.

Al día siguiente de la puesta, se les cambia
el agua desclorada a los embriones y se les deja desarrollar,
en la mayoría de los casos, a temperatura
ambiente (18±2°C del agua). Al cabo de unos 8 días,
alcanzan el estado 30-31, en el cual dejan de depender
de las reservas de vitelo y comienzan a comer, -
para lo cual se les suministran espinacas hervidas.

-h.-Puestas obtenidas.-

Para los experimentos con el estado 33 del - desarrollo, se utilizaron tres puestas:

La puesta nº1 se obtuvo a finales del mes de enero, resultando homogénea para el tipo de isoenzima LDH₅ "rápida". Se mantuvo en temperatura ambiente, en las condiciones ya citadas, hasta el estado 33, - en el que se colocaron en cámara fría para adaptar-- los a $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura del agua y obscuridad du-- rante 10, 30 y 60 días, períodos de tiempo durante los cuales no pasan de estado, al menos morfológicamente, siendo alimentados con espinacas. Al final de cada - período de adaptación se sacrifican y procesan como se expondrá más adelante, refiriéndose a estos tres grupos como "Frío 10 días", "Frío 30 días" y "Frío - 60 días".

La puesta nº2 se obtuvo a principios del mes de febrero, resultando también homogénea para el ti-- po de isoenzima LDH₅ "rápida". Se dejó desarrollar a temperatura ambiente, en las condiciones ya expues-- tas, hasta el estado 33, tiempo que coincidió con el día 10 de adaptación al frío de la puesta nº1. Puesto que ambas son homogéneas para el tipo de LDH₅, se u-- tilizaron los animales de la puesta nº2 como "Contro-- les" de la puesta nº1. Se miden las actividades de LDH de los animales adaptados durante 10 días al frío en el mismo día y en el mismo experimento que los controles.

La puesta nº3 se obtuvo para comprobar que - los efectos observados en las dos anteriores no se - debían a diferencias en la LDH entre ellas. Puesto - que la nº3 es heterogénea para el tipo de LDH₅, en-- contrándose animales con isoenzima "rápida", otros - con isoenzima "lenta" y otros, la mayoría, con isoen-- zima "intermedia". Se observó si el efecto de la adap--

tación al frío sobre las subunidades M no depende del tipo de LDH₅, utilizándose para los experimentos con la puesta nº3 sólo los animales de LDH₅ "intermedia".

Al cabo de un día de desarrollo, la puesta - nº3 alcanzó el estado de néurula, siendo la temperatura del agua del orden de $20 \pm 2^\circ\text{C}$; entonces se extrajo un grupo al azar de embriones y se trasladaron a la cámara fría ($8 \pm 2^\circ\text{C}$ en el agua y obscuridad), dejando que continúe el desarrollo hasta el estado 33, cosa que ocurre a los 90 días, denominando a este grupo "Frío-néurula" o "Grupo 3". Este grupo se utiliza con objeto de observar el efecto del frío a largo plazo. Cuando el contingente de animales de desarrollo a temperatura ambiente alcanza el estado de botón caudal, cosa que ocurre al día siguiente de alcanzar el estado de néurula, se extrajo otro grupo de animales al azar, trasladándolos a una estufa regulada de manera que la temperatura del agua fuera $29 \pm 2^\circ\text{C}$ y hubiera obscuridad; al cabo de 11 días alcanzaron el estado 33, denominando a este grupo "Calor". Este grupo de calor se utilizó con objeto de observar si el efecto de la temperatura elevada era opuesto al del frío. El resto del contingente se mantuvo a temperatura ambiente, en la que, al cabo de 13 días, 15 desde la puesta, llegaron al estado 33, separando otro grupo de animales que fué sacrificado, al que se denominó "Control" o "Grupo 1". El grupo restante se trasladó a la cámara fría, de donde se extrajeron a los 20 días de adaptación a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperíodo mínimo, para procesarlos, denominándoles "Frío 20 días" o "Grupo 2". En todos los casos, una vez terminado el período de adaptación experimental, se somete a las larvas en el estado 33 a los procesos pertinentes que se detallan más adelante.

-II.-METODOS DE OBSERVACION.-

-1.-Frecuencia cardiaca.-

-A.-Animales adultos.-

Se midió la frecuencia cardiaca de animales macho y hembra adultos de temperatura ambiente y adaptados al frío durante dos meses. No se esperó a los 5 meses puesto que algunos autores (Harri, 1974) han observado que, en la aclimatación de otros anfibios anuros al frío, la frecuencia cardiaca cae a unos valores mínimos en los cuatro primeros días de la aclimatación, no variando en el curso de las siguientes 18 semanas de aclimatación al frío.

Para la obtención de la frecuencia cardiaca se desarrolló el electrocardiograma (ECG) mediante el dinógrafo-polígrafo. Para ello se anestesia al ani--mal con éter y se le aplican los electrodos por pun--ción en las extremidades posteriores y en la unión -de la cintura pectoral con las extremidades anterior--res. Se realizan los registros, utilizándose las de--rivaciones necesarias para la visualización correcta del ciclo del latido cardiaco, y a partir de estos -registros se calcula el número de latidos por minuto.

-B.-Estado 33 del desarrollo.-

Utilizando animales de los grupos 1, 2 y 3 de la puesta nº3, se midió la frecuencia cardiaca de -las larvas al estado 33. Para ello se observó el nú--mero de latidos por minuto, mediante una lupa, en --larvas intactas anestesiadas con éter.

-2.-Consumo de oxígeno en el estado 33 del desarrollo.

Para el estudio del consumo de oxígeno de -las larvas de D. pictus pictus en el estado 33 del -desarrollo, se utiliza el método del respirómetro de Barcroft-Warburg. Este respirómetro consta de un ma--nómetro en forma de U con líquido de Brodie, con una rama abierta y otra cerrada que va unida a un matra--cito de unos 12 ml de volumen; este matracito tiene un pocillo central donde se ponen 0,2 ml de KOH al -

20% en agua destilada, agregándose después un cuadrado de papel de filtro de 1x2 cm dispuesto en acordeón para aumentar la superficie del álcali en contacto con el aire que hay dentro del matracito, y así asegurar una captación completa del CO_2 . En el resto de la base del matracito se ponen 4 ml de agua desclorada en la que se añaden dos larvas. Asegurándose del aislamiento completo del aire de la rama cerrada y del matracito con respecto del aire atmosférico, se mide la diferencia de presión entre la rama cerrada y la abierta, ajustando aquella a la presión inicial (punto de referencia), estos es, la que se tenía antes de cerrar la rama. Se corrigen estos valores con los obtenidos de un termobarómetro que se utiliza para detectar los cambios de presión no debidos al consumo de oxígeno de los animales.

Para transformar las lecturas corregidas del cambio de presión en los μl de O_2 consumidos por los animales, se necesita calcular las constantes (k) de cada matracito, lo cual se hizo mediante la fórmula:

$$k = \frac{Vg \frac{273}{T} + Vf \cdot \alpha}{P_o}$$

donde Vg es el volumen de la fase gaseosa en el matracito y en la rama cerrada del manómetro, hasta el punto de referencia.

Vf es el volumen de líquido en el matracito, - en este caso, 4,2 ml.

α es la constante de difusibilidad del O_2 en el agua desclorada, la cual depende de la temperatura, siendo 0,03793 a 10°C, 0,03091 a 20°C y 0,02822 ml O_2 /ml de agua a 25°C.

T es la temperatura, en grados Kelvin, a la que se realiza la medida de consumo de O_2 .

Po es la presión normal, 10.000 mm para el líquido de Brodie.

El cálculo del volumen de O_2 consumido por cada animal (metabolismo) se realiza dividiendo por 2 el consumo, x, obtenido a partir de las lecturas corregidas de los manómetros y la constante del matracito, mediante la siguiente expresión:

$$x = h \cdot k$$

donde h es la lectura corregida del cambio de presión.

k es la constante del matracito. (Umbreit et al, 1972).

Los matrascitos se sumergieron, para realizar las medidas, en un baño de agua termostatzado, en el que se agitaron constantemente, regulado a 10, 20 y 25°C. Así, se halla el metabolismo de larvas de desarrollo a temperatura ambiente ($18 \pm 2^\circ C$) y de larvas adaptadas durante 1 mes a $8 \pm 2^\circ C$ en cámara fría, el consumo de oxígeno por peso húmedo y el consumo de oxígeno por peso seco (tasa metabólica) de cada larva a las tres temperaturas expuestas, en actividad.

También se ha calculado el metabolismo estandar, el consumo de oxígeno por peso húmedo y la tasa metabólica estandar en las larvas adaptadas a temperatura ambiente y en las de frío, midiendo el consumo de oxígeno de estas larvas anestesiadas con MS -- 222 (etil m-aminobenzoato metanosulfonato) de la casa SANDOZ.

-3.-Medidas de las actividades LDH.-

-A.-Animales adultos.-

-a.-Preparación de muestras.-

Una vez extraídos el lóbulo central del hígado y el corazón y el cerebro enteros, se procede a su homogeneización. Esta se realiza en homogeneizadores de vidrio tipo Pobel, de unos 12 ml de capacidad, en una solución tamponada TRIS-ClH 0,1M pH 7,4 conteniendo sacarosa 0,25M. El volumen de esta solución se añadía en la proporción 20 mg de tejido por ml.

El homogenado se centrifugó a 5.000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente. Se extrae el sobrenadante, del cual una parte se conserva en frío - para las determinaciones de actividad específica, que se realizaron en el mismo día que las muestras según se expondrá más adelante, y otra parte se congela a -20°C para las electroforesis que se realizan dentro de un período no superior a un mes.

-b.-Actividad específica por mg de tejido fresco.-

Este tipo de medidas se realizó siguiendo el método descrito por Bergmeyer et al. (1965), con algunas modificaciones, utilizando un tampón fosfato - 0,05 M a pH 7,4 que contiene piruvato $3,1 \times 10^{-4}$ M, -- formado por fosfato bipotásico 0,05 m y fosfato monopotásico $0,3 \times 10^{-3}$ M. Para la reacción y su cuantificación se utiliza el espectrofotómetro a 340 nm y unas cubetas de cuarzo de 3 ml de volumen y de un paso de luz de 1 cm. Las concentraciones finales de piruvato y NADH utilizadas fueron $3,4 \times 10^{-4}$ y $1,5 \times 10^{-4}$ M respectivamente.

Después de añadir la muestra convenientemente diluida, se mide la variación en la transmitancia por medio del inscriptor durante 4-5 minutos. Mediante las correspondientes tablas de conversión, se determina la disminución de absorbancia por minuto, esto es, el incremento de densidad óptica (ΔDO). La actividad se da en μ moles de NADH oxidados por minuto por mg de tejido fresco por centímetro de paso de luz de la cubeta, utilizando la siguiente expresión:

$$\mu \text{ moles de NADH} = \frac{\Delta DO \times f \times V}{\epsilon \times 10^{-3} \times v \times p \times 1 \text{ cm}}$$

donde f es el factor de dilución de la muestra, en el caso del corazón 21 y en el del hígado y cerebro 6.

V es el volumen de la cubeta, 3 ml.

ϵ es el coeficiente de extinción molar del NADH ($6.220 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$).

p es el peso de tejido por ml de TRIS-sacarosa, 20 mg/ml.

v es el volumen de muestra diluida que se añade a la mezcla de reacción, 0,1 ml.

l cm es el paso de luz de la cubeta.

Los datos así obtenidos se procesaron para hallar las características muestrales: media, varianza muestral corregida y desviación típica.

-c.-Actividad específica por mg de proteína.-

Se determinó la cantidad de proteínas (mg/ml), por el método de Lowry et al. (1951), presentes en los sobrenadantes y, partiendo de los datos de la actividad específica por mg de tejido fresco, se calcularon los μ moles de NADH reducidos por minuto por miligramo de proteína del sobrenadante por cm de paso de luz de la cubeta.

-d.-Actividades relativas de las isoenzimas y de las subunidades.-

-i.-Preparación de geles.-

Para la separación de las isoenzimas de LDH se utilizó la técnica descrita por Orstein (1964) y Davis (1964), introduciendo algunas modificaciones. Para la elaboración de los geles de poliacrilamida necesarios para llevar a cabo la electroforesis, se emplearon tubos de vidrio de una longitud de 75 mm abiertos por los dos extremos, y con un diámetro externo de 7 mm y un diámetro interno de 5 mm.

Para los experimentos de la influencia de la adaptación experimental al frío, se utilizaron geles únicos de una concentración de acrilamida del 7,5%. Para la elaboración de estos geles se partió de las siguientes soluciones y las siguientes proporciones

en la mezcla de polimerización:

Soluciones	Proporción en la mezcla de polimeri zación.
-Tampón-Catalizador nº1	
TRIS-ClH-TEMED 3M, pH 8,9	
ClH 1N	48 ml
TRIS (3M)	36,6 g
TEMED	0,23 ml
Agua destilada hasta 100 ml	1
-Monómero	
Acrilamida al 30%	
Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,74 g
Agua destilada hasta 100 ml	2
-Agua destilada	1
-Catalizador nº2	
Persulfato amónico al 0,14%	4

Estas proporciones se mezclan con cuidado de no formar burbujas. Una vez preparada la mezcla, se añaden 1,2 ml de esta en los tubos, previamente cerrado un extremo con papel de parafina y dispuestos en posición vertical, mediante una jeringa. Una vez terminada esta operación, se depositan unas gotas de agua sobre la mezcla mediante una pipeta Pasteur con una aguja fina acoplada y con cuidado para que se formen dos fases bien definidas; esta operación se realiza con objeto de eliminar el menisco superior de la mezcla de polimerización y evitar el contacto directo con el aire. La mezcla polimeriza entonces, a la luz del día, en menos de 30 min, formándose un gel de 60 mm de longitud.

Con objeto de obtener una separación de las isoenzimas más neta para que la cuantificación fuera aún más eficaz, se introdujeron algunas modificacio-

nes en la elaboración de los geles en el experimento sobre la influencia de la estación. Estas modificaciones consistieron en la variación de los componentes del tampón-catalizador nº1 TRIS-ClH-TEMED y en la adición de un gel de poro grande, con una concentración de acrilamida del 2,5%, sobre el gel de poro pequeño, 7,5% de acrilamida. Así que se elaboraron geles de esta última concentración de acrilamida según se ha descrito en el párrafo anterior, pero utilizando el siguiente tampón-catalizador nº1:

-TRIS-ClH-TEMED 3M, pH 9,3	
ClH 1N	48 ml
TRIS (3M)	36,6 g
TEMED	0,46 ml
Agua destilada hasta	100 ml

La polimerización de esta mezcla tarda unos 15 min, después de los cuales se extrae el líquido sobrando que queda sobre el gel y se seca con una papel de filtro con cuidado de no tocar la superficie de este. Sobre esta parte superior del gel del 7,5% se añade la mezcla de polimerización, un volumen de 0,1 ml, del gel del 2,5% de acrilamida, la cual se prepara a partir de las siguientes soluciones y con las siguientes proporciones de estas:

Soluciones	Proporciones en la mezcla de polimerización.
-TRIS-ClH-TEMED 3M, pH 9,3	
La misma utilizada para la elaboración del gel del 7,5%	1
-Acrilamida al 10%	
Acrilamida 10 g	
Bisacrilamida 2,5 g	
Agua destilada hasta 100 ml	2
-Agua destilada	1
-Persulfato amónico al 0,14%	4

Con esta mezcla se procede de manera similar a la descrita en los otros geles, añadiendo 0,1 ml de ella sobre el gel del 7,5%, como ya se ha dicho. La polimerización se realiza en 15 min, quedando formado un gel blanquecino de unos 3mm de longitud. Los geles dobles obtenidos, se dejan reposar durante 1 o 2 h antes de iniciar la electroforesis.

-ii.-Electroforesis.-

La electroforesis se llevó a cabo siguiendo también el método descrito por Orstein (1964) y Davis (1964) con algunas modificaciones. Así, una vez terminado el período de reposo de después de la polimerización de los geles, se montaron estos en las cubetas de electroforesis. La solución que media entre los electrodos de platino y los geles, se prepara a partir de la siguiente solución tamponada madre:

-TRIS-Glicocola 0,05M, pH 8,3

TRIS (0,05M) 6 g

Glicocola (0,38M) 28,8 g

Agua destilada hasta 1 litro

la cual se diluye 1/10 en agua destilada antes de añadirla a la cubeta de electroforesis en el caso del experimento sobre la influencia experimental de frío, ayuno y obscuridad. Una vez montadas las cubetas con los geles y la solución TRIS-glicocola, se depositan 20 μ l de cada muestra mediante una pipeta fina directamente sobre el gel. A continuación, se procede a la electroforesis en cámara fría (4-9°C), durante 2 horas, manteniendo una intensidad constante de 3mA - por gel, alcanzándose una diferencia de potencial de 340-390V. Al finalizar la electroforesis, la cubeta superior tenía una temperatura de 24-26°C.

En el caso de los experimentos sobre la influencia de la estación, se diluye la solución madre de TRIS-glicocola antes descrita 1/5 en agua destilada

da como paso previo al llenado de las cubetas. Esta variación se hizo también en orden a encontrar la -- máxima resolución del sistema, evitando una excesiva subida de voltaje durante el desarrollo de la elec-- troforesis. Una vez montadas las cubetas con el TRIS-glicocola y los geles, se añaden las muestras de forma idéntica a la descrita anteriormente. Se procede a la electroforesis, también en cámara fría, durante 30 min a 1mA por gel, con lo que se alcanza una diferencia de potencial de 40-50V, después de lo cual, se eleva la intensidad hasta 3mA por gel, manteniéndose constante durante los 90 min restantes. El proceder así, nos asegura, de nuevo, una mejor resolución. Al final de la electroforesis, la diferencia de potencial, cuya subida es gradual durante el desarrollo de aquella, a partir de 150V, alcanza los 200-240V, oscilando las temperaturas de las cubetas entre los 24-28°C.

-iii.-Revelado de las bandas de actividad y cuantificación de estas.-

En todos los casos, finalizada la electroforesis, se procede a la extracción de los geles. Para ello, se emplea una aguja fina con objeto de separar el gel del tubo de vidrio, manipulando siempre bajo el agua.

Para poner de manifiesto las zonas del gel ocupadas por las isoenzimas, se incuban los geles, individualmente en tubos de hemolisis, en obscuridad a 36°C durante 7 min con una solución compuesta por 12 ml de tampón TRIS-ClH 0,05M pH 7,4; 6 ml de DL-lactato sódico 0,4M; 7 ml de nitroazul de tetrazolio -- (NBT) 2mg/ml; 0,3 ml de metosulfato de fenazina (PMS) 2mg/ml; en la que se disuelven 20 mg de NAD[†], dando una concentración final de 95 y 1,2 mM de lactato y NAD[†] respectivamente (Langvad, 1968).

Una vez reveladas las bandas de actividad LDH, se lavan los geles con agua desionizada fría, se fijan con una solución de ácido acético al 7,5% y se conservan en obscuridad hasta su posterior cuantificación en el densitómetro. Durante la cuantificación, el integrador del aparato da unos números que son proporcionales al área del pico que se obtiene de cada isoenzima, a partir de los cuales se extrae el porcentaje de cada una de ellas en cada gel, refiriendo el 100% a la suma de las áreas de los picos de las 5 isoenzimas.

Suponiendo el hecho de que las isoenzimas de LDH están compuestas por cuatro subunidades de dos tipos: H y M, como en la mayoría de los vertebrados, se halló el porcentaje de dichas subunidades en cada muestra, realizando la siguiente operación:

$$H = LDH_1 + 3/4 LDH_2 + 1/2 LDH_3 + 1/4 LDH_4$$

$$M = 1/4 LDH_2 + 1/2 LDH_3 + 3/4 LDH_4 + LDH_5$$

partiendo de los porcentajes de cada una de las isoenzimas.

Los datos correspondientes al porcentaje de isoenzimas y al porcentaje de subunidades H y M de cada grupo de experimentos, se procesaron para la obtención de las características muestrales tal y como se describirá más adelante.

-e.-Km para el lactato.-

Las medidas de la Km para lactato de las isoenzimas de LDH de D. pictus pictus se realizan a partir de muestras de sobrenadantes obtenidos de ovario de forma idéntica a la descrita para otros tejidos. Los sobrenadantes se congelaron a -20°C hasta el momento de su utilización, dentro de los dos meses siguientes y se prepararon a partir de animales recién capturados a mediados del mes de diciembre y de ani-

males mantenidos en condiciones experimentales de --
frío ($8 \pm 2^\circ\text{C}$), ayuno y obscuridad durante 5 meses a --
partir de aquel.

-i.-Preparación de geles.-

Para este grupo de experimentos, se prepararon geles únicos de una concentración de acrilamida del 6,5%. Este cambio se realizó para tener una separación mejor de las isoenzimas de este tejido y una cuantificación más exacta. Este tipo de gel, con un contenido de acrilamida menor y, por lo tanto, con un poro más grande que el del 7,5%, se prepara a partir de las mismas soluciones que el del 7,5% único -- del experimento de adaptación al frío, pero variando las proporciones de acrilamida y de agua en la -- mezcla de polimerización, tal y como se expresa a -- continuación:

Soluciones	Proporción en la mezcla de polimerización
-TRIS-ClH-TEMED 3M, pH 8,9	10
-Acrilamida al 30%	17
-Agua destilada	13
-Persulfato amónico al 0,14%	40

Por lo demás, las siguientes operaciones fueron exactamente iguales que en los otros casos.

-ii.-Electroforesis.-

Los geles se montan en las cubetas en condiciones similares a las descritas en el grupo de adaptación experimental al frío, ayuno y obscuridad, al igual que las operaciones siguientes. Se procedió a la electroforesis en cámara fría ($4-9^\circ\text{C}$) a 1mA por -- gel durante 15 min, subiendo después la intensidad a 3mA por gel, manteniendo esta intensidad constante -- durante 90 min, período en el que se alcanzó una diferencia de potencial de 340-390V. Al finalizar la e

lectroforesis, la cubeta superior tenía una temperatura de 24-26°C.

-iii.-Revelado y cuantificación de las bandas de actividad.-

Finalizada la electroforesis, se procede a la extracción de los geles según el método descrito anteriormente. Una vez extraídos, se incuban individualmente en tubos de hemolisis a 36°C durante 6 min en una solución semejante a la descrita en los experimentos de actividad relativa: 12 ml de TRIS-ClH - 0,05M, pH 7,4; 7 ml de NBT 2mg/ml; 0,3 ml de PMS 2 - mg/ml, en la que se disuelven 20 mg de NAD⁺. Se prepararon soluciones acuosas con distintas concentraciones de lactato: 3,25; 1,62; 0,31; 0,65; 0,32; 0,16; 0,08 y 0,04 M. Se pipetearon 2,4 ml de la solución - reveladora sin lactato en los tubos de hemolisis, a la que se añaden 0,75 ml de la solución de lactato - correspondiente, obteniéndose unas concentraciones - finales de este de 0,77; 0,39; 0,19; 0,15; 0,076; -- 0,038; 0,019 y 0,0095 M, de manera que siempre había dos tubos con la misma concentración de lactato. Se mezclaron bien estas dos partes por inversión, y, una vez finalizada la electroforesis y extraídos los geles, se introdujo un gel en cada uno de los tubos preparados (todos los geles habían corrido la misma cantidad de muestra de un mismo sobrenadante) y se - realizó la incubación en las condiciones apuntadas. Finalizado el tiempo de reacción, se para esta según se describió en los experimentos de actividad relativa.

Los geles se cuantificaron en el densitóme--tro, de manera que se utiliza, al proceder de manera similar a la ya descrita, el número que proporciona el integrador del aparato como índice de la veloci--dad de reacción de las isoenzimas de LDH frente a --

las distintas concentraciones de lactato. Con aquellos valores y los de las concentraciones, se halla la ecuación que define a la recta de regresión en una representación de Lineweaver-Burk de dobles recíprocos, de forma que una vez hallada, haciendo $y = 0$ se obtiene $-1/K_m$, a partir del cual es fácil calcular el valor de K_m para lactato de cada isoenzima, expresándose dichos valores en milimoles por litro.

-B.-Estado 33 del desarrollo.-

-a.-Preparación de muestras.-

Para la preparación de muestras se homogenizó una larva, previa extirpación del tubo digestivo, en 0,5 ml de TRIS-sacarosa 0,1M pH 7,4 preparado según se ha descrito para el animal adulto. El tubo digestivo se extrae para evitar la desnaturalización de las isoenzimas que pudieran provocar las enzimas proteolíticas de aquel. Los procesos de homogenización y centrifugación se realizaron en las mismas condiciones que en los tejidos del animal adulto. Una vez centrifugados los extractos, se extrajeron los sobrenadantes con una pipeta Pasteur y se guardaron en frío (4-9°C) hasta su utilización dentro del mismo día.

-b.-Actividad total.-

Se utilizó el mismo método descrito para la actividad específica por mg de tejido fresco de los tejidos del animal adulto, con la única diferencia de la fórmula utilizada para la obtención de datos, los cuales se expresan en μ o nmoles de NADH oxidados por minuto por animal por cm de paso de luz de la cubeta

$$\mu \text{ moles NADH} = \frac{\Delta D \times f \times V \times V'}{\epsilon \times 10^{-3} \times v \times 1 \text{ cm}}$$

donde f es el factor de dilución, normalmente 6.

ΔD es el incremento de densidad óptica por min.

V es el volumen total de la cubeta, 3 ml.

V' es el volumen de TRIS-sacarosa en que se homogenizaron cada una de las larvas, 0,5 ml.

ϵ es el coeficiente de extinción molar del NADH.

v es el volumen de muestra diluida, 0,1 ml.

l cm es el paso de luz de la cubeta.

Los datos así obtenidos se procesaron para obtener las características muestrales, según los métodos que se expondrán más adelante.

-c.-Actividad específica.-

Para la obtención de los datos correspondientes a la actividad específica por mg de proteína, se procedió de manera similar a la expuesta en el caso del animal adulto. En primer lugar se halla, mediante el método de Lowry et al. (1951), el contenido, en mg, de proteína en 0,5 ml de sobrenadante ; puesto - que la actividad total está referida a 0,5 ml de este, se divide la actividad por el contenido de proteínas, obteniéndose los μ moles de NADH oxidados por - min por mg de proteína del sobrenadante por cm de paso de luz de la cubeta.

-d.-Actividades relativas de las isoenzimas y de las subunidades.-

Todo el proceso relacionado con la separación y cuantificación de las isoenzimas de LDH se realizó en idénticas condiciones a las descritas en el experimento sobre las variaciones inducidas por la estación en los animales adultos, descrito anteriormente.

-III.-METODOS ESTADISTICOS.-

-A.-Características muestrales.-

Los datos obtenidos en todos los tipos de observaciones, se procesaron para la obtención de las características muestrales. Así, se hallaron:

-la media de cada grupo de datos:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

siendo: n el número de valores observados,

x cada uno de los valores observados;

-la varianza muestral corregida, puesto que n es un valor moderado:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

-y la desviación típica de la muestra, haciendo la raíz cuadrada de s^2 (Cramér, 1972).

-B.-Prueba "t" de Student.-

Para la comparación de los grupos de datos de las diferentes muestras, se aplicó la prueba "t" de Student, utilizando un intervalo de confianza del 95%, esto es, los valores de $p < 0,05$ que resultan de la comparación de las medias, indican que hay menos de un 5% de probabilidades de que las dos poblaciones representadas por estas medias sean la misma. Se ha elegido la prueba "t" porque es la única que, previa demostración de que los valores de las muestras elegidas presentan una distribución normal, permite trabajar con valores moderados de n. Se ha podido comprobar que los datos de este trabajo se ajustan a una distribución normal.

Para obtener los valores de "t" se empleó la siguiente expresión (Cramér, 1972):

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\left[\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right] \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$$

donde \bar{x} es la media de la muestra de datos 1

\bar{y} es la media de la muestra de datos 2

n_1 es el número de observaciones de la muestra 1

n_2 es el número de observaciones de la muestra 2

s_1^2 es la varianza muestral corregida de la muestra 1
 s_2^2 es la varianza muestral corregida de la muestra 2.

Con lo valores de t obtenidos, se acude a -- las tablas de distribución "t" y se busca el valor de p para $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad, de forma que -- si este valor es mayor que 0,05, la diferencia entre las muestras no es significativa (NS) y si resulta -- menor que 0,05, la diferencia entre estas sí que es significativa (S) (Cramér, 1972).

-C.-Ajuste de una recta de regresión lineal por mínimos cuadrados.-

Para los ajustes por mínimos cuadrados de la recta que define a la nube de puntos de una representación conjunta de dos variables dependientes, se -- han utilizado las siguientes expresiones:

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}; \quad a = \bar{y} - b\bar{x}.$$

siendo los valores a y b los que determinan la ecuación de la recta que se buscaba, $y = a + bx$.

RESULTADOS

-I.-FRECUENCIA CARDIACA EN LA ADAPTACION AL FRIO.-

-1.-Animales adultos.-

Los datos obtenidos sobre la frecuencia cardiaca de D. pictus pictus adulto, expresados en latidos/min, se encuentran en la tabla I. En dicha tabla se puede observar que existe un descenso significativo de la frecuencia cardiaca ($0,01 > p > 0,001$) en los animales adaptados durante un mes a baja temperatura ($8 \pm 2^\circ \text{C}$), ayuno y obscuridad, con un valor de 53 latidos/min, frente a los de temperatura ambiente, que mostraron un valor de 66 latidos/min. (Fig. 1)

-2.-Larvas en el estado 33 del desarrollo.-

La tabla I muestra también los resultados obtenidos sobre la frecuencia cardiaca de las larvas en el estado 33. Se puede observar que el grupo de temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$), control, presenta una frecuencia cardiaca media de 160 latidos/min, mientras que el grupo de frío ($8 \pm 2^\circ \text{C}$) durante 20 días tiene una frecuencia media de 137 latidos/min, siendo significativa esta diferencia ($0,001 > p$). El grupo de frío -- desde néurula mostró una frecuencia de 142 latidos/min, siendo este valor significativamente distinto -- de el del grupo control ($0,02 > p > 0,01$), mientras que -- no lo es de el del grupo de frío de 20 días. De manera que se observa una disminución significativa de la -- frecuencia cardiaca con la adaptación al frío, sin -- que en ello influya el tiempo que dure dicha adaptación.

-II.-CONSUMO DE OXIGENO EN EL ESTADO 33 DEL DESARROLLO.-

En este grupo de experimentos, se ha observado que los animales adaptados a $18 \pm 2^\circ \text{C}$ y medido el consumo de oxígeno a 10°C , muestran un metabolismo activo de 12,83 μl de O_2 por larva, frente a 7,79 de -- los animales adaptados a $8 \pm 2^\circ \text{C}$ y medido el consumo a

TABLA I

FRECUENCIA CARDIACA EN DISCOGLOSSUS PICTUS MANTENIDOS A TEM-
PERATURA AMBIENTE ($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y EN FRIO ($8 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

FRECUENCIA (latidos/min)	CONTROLES	F R I O
<u>ADULTO</u>	66 ± 4 (7)	53 ± 1 (3) *
<u>LARVAS</u> est. 33	160 ± 15 (16)	137 ± 13 (17) (a)** 142 ± 21 (12) (b)***

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación
típica.

Entre paréntesis en número el total de animales en cada
grupo. Entre paréntesis en letras : a) Frio de 20 días b)
en frio desde el estado de néurula.

(*) Descenso significativo ($p < 0,01$)

(**) Descenso significativo ($p < 0,001$)

(***) Descenso significativo ($p < 0,02$)

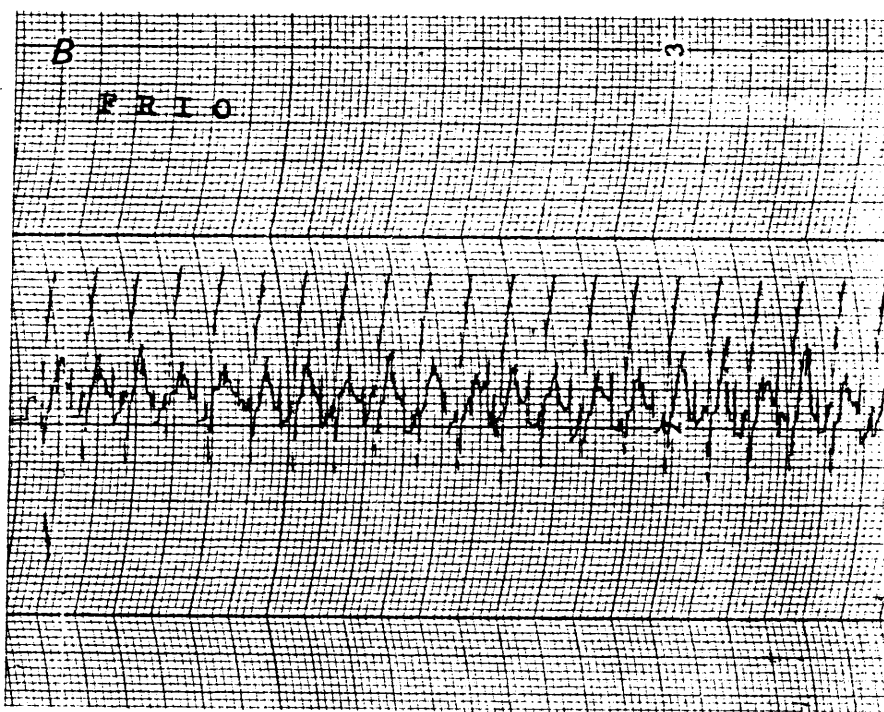
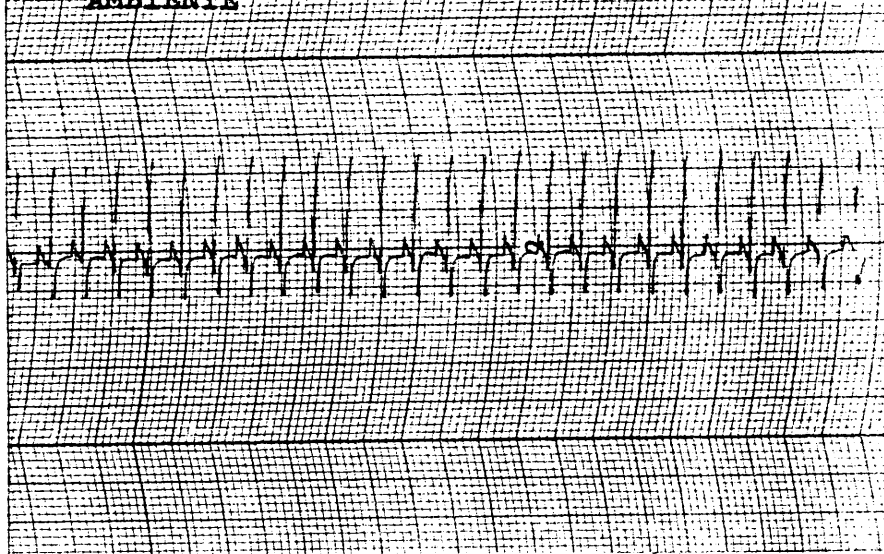


Fig. 1. Electrocardiograma de Discoglossus pictus pictus mantenidos a temperatura ambiente y en frío. A) frecuencia cardiaca 65 latidos por minuto. B) frecuencia cardiaca 52 latidos por minuto.

10°C, una tasa metabólica activa de 2,94 frente a 0,66 μ l de O_2 por mg de peso seco y un consumo de O_2 por peso húmedo de 0,17 frente a 0,05 μ l, como valores medios (Tabla II). Los adaptados a temperatura ambiente ($18 \pm 2^\circ C$) y medidos a 20°C tienen un metabolismo activo de 19,14 frente a 15,73 de los adaptados a frío ($8 \pm 2^\circ C$) medidos a 20°C, una tasa metabólica activa de 4,37 frente a 1,31 y un consumo de O_2 por peso húmedo de 0,26 frente a 0,11. Los adaptados a temperatura ambiente y medidos a 25°C tienen un metabolismo activo de 21,09 frente a 18,33 de los adaptados a frío y medidos a 25°C, una tasa metabólica activa de 4,82 frente a 1,54 y un consumo de O_2 por peso húmedo de 0,28 frente a 0,13. Las diferencias son tan evidentes y -- las desviaciones típicas tan bajas (Tabla II), que no fué necesario emplear la prueba "t" de Student.

La medida de la velocidad de aumento (o disminución) del consumo de oxígeno con la temperatura -- (Q_{10}) entre 10 y 20°C para el metabolismo activo de -- los animales adaptados a temperatura ambiente, 1,50, es, además, sensiblemente inferior a la de los animales adaptados al frío, 2,02, permaneciendo con valores similares en los dos grupos entre 20 y 25°C, siendo 1,21 para el grupo adaptado a $18 \pm 2^\circ C$ y 1,36 en el grupo de frío (Tabla II).

La relación entre los dos grupos de animales adaptados es similar cuando se emplea la anestesia, a excepción de las larvas adaptadas al frío y medido el consumo de O_2 a 10°C, cuyo valor medio de metabolismo estandar, 10,71, es superior al del grupo adaptado a temperatura ambiente y medido a 10°C, 7,31, y al metabolismo activo del grupo adaptado al frío y medido a 10°C, 7,79. En los demás grupos de medidas del metabolismo estandar, se puede observar que los valores son siempre inferiores a los de las medidas correspondientes de metabolismo activo, y los del grupo de larvas adaptadas al frío son menores que los del grupo adap-

TABLA II

CONSUMO DE OXIGENO EN LARVAS DE DISCOGLOSSUS PICTUS EN PRE
METAMORFOSIS (ESTADO 33) ADAPTADAS A TEMPERATURA AMBIENTE
($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) Y A FRIO ($8 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

ESTADO 33	TEMPERATURA DE MEDIDA		
	10°	20°	25°
AMBIENTE (8)			
$\mu\text{l O}_2/\text{larva/h}$	$12,8 \pm 0,69$	$19,1 \pm 0,7$	$21,09 \pm 0,7$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.s/h}$	$2,9 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$	$4,82 \pm 0,2$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.h/h}$	$0,2 \pm 0,008$	$0,26 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$
FRIO (10)			
$\mu\text{l O}_2/\text{larva/h}$	$7,79 \pm 1,9$	$15,73 \pm 0,5$	$18,33 \pm 0,7$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.s/h}$	$0,66 \pm 0,2$	$1,31 \pm 0,13$	$1,54 \pm 0,21$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.h/h}$	$0,05 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$

Entre paréntesis se expresa el número de embriones utilizados en cada experiencia. Peso seco: p.s.; peso húmedo: p.h.

../..

TABLA II

CONSUMO DE OXIGENO EN LARVAS ANESTESIADAS DE DISCOGLOSSUS PICTUS EN PREMETAMORFOSIS (ESTADO 33) ADAPTADAS A TEMPERATURA AMBIENTE ($18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) Y A FRIO ($8 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

LARVAS ANESTESIADAS ESTADO 33	TEMPERATURA DE MEDIDA		
	10°C	20°C	25°C
AMBIENTE (8)			
$\mu\text{l O}_2/\text{larva/h}$	$7,31 \pm 0,23$	$14,07 \pm 0,66$	$18,56 \pm 1,46$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.s./h}$	$1,67 \pm 0,07$	$3,30 \pm 0,1$	$4,24 \pm 0,3$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.h./h}$	$0,10 \pm 0,008$	$0,19 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$
FRIO (10)			
$\mu\text{l O}_2/\text{larva/h}$	$10,71 \pm 0,78$	$12,30 \pm 0,5$	$13,52 \pm 0,8$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.s./h}$	$0,90 \pm 0,15$	$1,03 \pm 0,15$	$1,14 \pm 0,20$
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.h./h}$	$0,08 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,03$

Entre paréntesis se expresa el número de embriones utilizados en cada experiencia. Peso seco: p.s.; peso húmedo: p.h.

tado a temperatura ambiente, en lo que se refiere a - metabolismo estandar; así, en las medidas a 20°C, los animales adaptados a 18±2°C anestesiados dan unos valores de consumo de O₂ por larva de 14,07, mientras que los adaptados al frío los dan de 12,30; en las medidas a 25°C, el metabolismo estandar de los animales adaptados a temperatura ambiente es de 18,56 y el de los de frío es de 13,52.

La tasa metabólica estandar de los animales a daptados al frío, 0,90, es, también, más alta que la tasa metabólica activa de este mismo grupo, siendo, - sin embargo, inferior a la tasa metabólica estandar, 1,67, del grupo adaptado a la temperatura ambiente -- cuando se miden a 10°C. Las tasas metabólicas estandar de los otros grupos de medidas, a 20 y 25°C, son siempre inferiores a las tasas metabólicas activas pa ra 20 y 25°C (Tabla II), con unos valores medios de - 3,30 en los animales adaptados a temperatura ambiente y 1,30 en los de frío cuando se miden a 20°C y de 4,24 y 1,14 cuando se miden a 25°C. Con el consumo de O₂ - por peso húmedo de las larvas anestesiadas ocurre algo similar que con la tasa metabólica estandar, siendo de 0,1 y 0,08 en los animales medidos a 10°C; 0,19 y 0,09 en los medidos a 20°C; y 0,25 y 0,10 en los me didos a 25°C en los grupos adaptados a temperatura am biente y al frío respectivamente (Tabla II).

Todos estos resultados inducen a hablar de "a daptación en lugar de "aclimatación", con respecto al resto de los resultados.

-III.-DIMENSIONES CORPORALES.-

-1.-Pesos de los animales adultos en la adaptación ex perimental al frío, ayuno y fotoperiodo mínimo.-

Durante el periodo de adaptación a la baja -- temperatura, los animales adultos muestran unas ligeras pérdidas de peso. El peso medio de los animales -

al iniciarse el proceso de adaptación es de $8,16 \pm 1,06$ g, mientras que al terminar dicho proceso, 5 meses -- después, el peso medio es de $7,66 \pm 0,79$ g, siendo, por tanto, el peso medio perdido de 0,50 g, diferencia -- que no resultó estadísticamente significativa. Se recuerda que en el transcurso de la adaptación los animales no fueron alimentados.

-2.-Tamaños en el estado 33 del desarrollo.-

-A.-Adaptación al frío.-

Durante el experimento nº2 realizado con la puesta nº3, antes de sacrificar los animales al estado 33, se obtuvieron los datos correspondientes al tamaño de la región cefalotruncal (cabeza-torax) y de la región caudal (cola), los cuales se encuentran en la tabla III. Así, se observa que el grupo de frío -- desde néurula tiene un tamaño de la región cefalotruncal de 8,43 mm, cifra que es significativamente superior ($0,001 > p$ en ambos casos) a los 7,08 mm del grupo de frío de 20 días y a los 7,03 mm del grupo control de temperatura ambiente. Sin embargo, la diferencia -- entre estas dos últimas no resultó significativa. En cuanto al tamaño de la región caudal, el grupo de --- frío desde néurula presenta 13,60 mm de longitud media, valor que es significativamente superior ($0,001 > p$ en ambos casos) que el del grupo de frío de 20 -- días, 11,75, y el del control, 12,34 mm. La diferen-- cia entre estos dos últimos valores es significativa ($0,02 > p > 0,01$), siendo menor la longitud del grupo de frío.

En resumen, los animales del grupo de frío -- desde néurula resultaron mayores, significativamente, que los de los otros dos grupos. Sin embargo, los animales adaptados a frío durante 20 poseían una cola de menores dimensiones.

-B.-Adaptación al calor.-

LONGITUDES DE LAS LARVAS DE DISCOGLOSSUS PICTUS EN PREMETAMORFOSIS (ESTADO 33) SOMETIDAS A DIFERENTES TEMPERATURAS (SUBUNIDAD M HIBRIDA)

	CABEZA-TRONCO (mm)	COLA (mm)
CONTROLES (16)	$7,03 \pm 0,13$	$12,34 \pm 0,70$
FRIO 20 d. (24)	$7,08 \pm 0,5$	$11,75 \pm 0,72^{**}$
FRIO desde NEURULA (16)	$8,43 \pm 0,50^{*}$	$13,60 \pm 0,66^{*}$
CALOR 10d. $29 \pm 2^{\circ}\text{C.}$ (16)	$7,13 \pm 0,5$	$12,5 \pm 0,5$

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo.

Cambio significativo ($p < 0,001$) (*)

Cambio significativo ($p < 0,02$) (**).

La tabla III contiene también los resultados obtenidos al medir la longitud de la región cefalotruncal y de la región caudal del grupo de animales del experimento nº2 adaptados al calor ($29 \pm 2^\circ\text{C}$). En ella se incluyen también las comparaciones, mediante la prueba t, con los animales del experimento nº2 de frío realizado también con la puesta nº3. En esta comparación se vió que el incremento que presenta el grupo que nos ocupa en la longitud media de la región cefalotruncal, alcanzando los 7,13 mm, con respecto al grupo control (temperatura ambiente), 7,03 y al grupo de frío de 20 días, 7,08 mm, no es significativo. Sin embargo, la longitud de esta misma región en el grupo de frío desde néurula (8,43 mm) es significativamente mayor ($0,001 > p$) que la del grupo adaptado al calor.

Por otro lado, la longitud de la región caudal, 12,56 mm, no es significativamente superior a la del grupo control, 12,34 mm, pero sí lo es ($0,001 > p$) con respecto a la longitud del grupo de frío de 20 días, 11,75 mm. El grupo de frío desde néurula posee un tamaño de esta región, 13,60 mm, significativamente mayor ($0,001 > p$) que el del grupo adaptado a calor.

De manera que, el grupo de animales adaptados al calor posee una longitud media semejante a la del grupo adaptado a temperatura ambiente. Sin embargo, la longitud de la región caudal es mayor que la del grupo de frío de 20 días. Por otro lado, la longitud total del grupo adaptado al calor es menor que la del de frío desde néurula.

-IV.-ACTIVIDADES DE LA LDH.-

-1.-Animales adultos.-

-A.-Adaptación experimental al frío, ayuno y fotoperiodo mínimo.-

-a.-Actividad específica por mg de tejido fresco.-

Los datos correspondientes a la actividad es-

pecífica por mg de tejido fresco del hígado, corazón y cerebro de este experimento, se encuentran en la tabla IV. Con respecto a los resultados obtenidos en el hígado se puede ver un aumnto no significativo de esta actividad, dada en nmoles de NADH oxidados por min por mg de tejido fresco, con la adaptación al frío. - En cuanto al corazón, se aprecia también un aumento - no significativo con la adaptación a $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Sin embargo, en el cerebro, tejido en el que se observa también un aumento de esta actividad, el cambio resultó significativo ($0,02 > p > 0,01$), pasando de 59 en el grupo control a 71 nmoles de NADH/min/mg de tejido fresco en el grupo adaptado a frío (Ver parte superior de la figura 7).

-b.-Actividad específica por mg de proteína.-

En la tabla IV se encuentran también los datos obtenidos en la actividad específica por mg de proteina, expresados en µmoles de NADH oxidados por min por mg de proteína, en los tres tejidos estudiados: corazón, hígado y cerebro. Se observaron descensos en esta actividad, siendo significativo ($0,02 > p > 0,01$) solo el del corazón, bajando de 5,33 a 4,12 con la adaptación al frío (Ver parte superior de la Fig. 8).

-c.-Actividades relativas de las isoenzimas y de las subunidades.-

-i.-Heterogeneidad de la LDH₅.-

En este grupo de adaptación de hembras adul--tas a condiciones experimentales de frío, ayuno y obscuridad, no se detectó heterogeneidad con respecto a la LDH₅, siendo esta isoenzima del tipo que se deneminó como "rápida", según su velocidad electroforética.

-ii.-Actividades relativas.-

En las figuras 2a, 2b y 3 se encuentran repre--sentados unos zimogramas típicos y sus correspondientes lecturas del densitómetro, de las isoenzimas de -

TABLA IV

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LDH EN TEJIDOS DE
DISCOGLOSSUS PICTUS ADULTOS SOMETIDOS A HIBERNACION EXPERI-
MENTAL

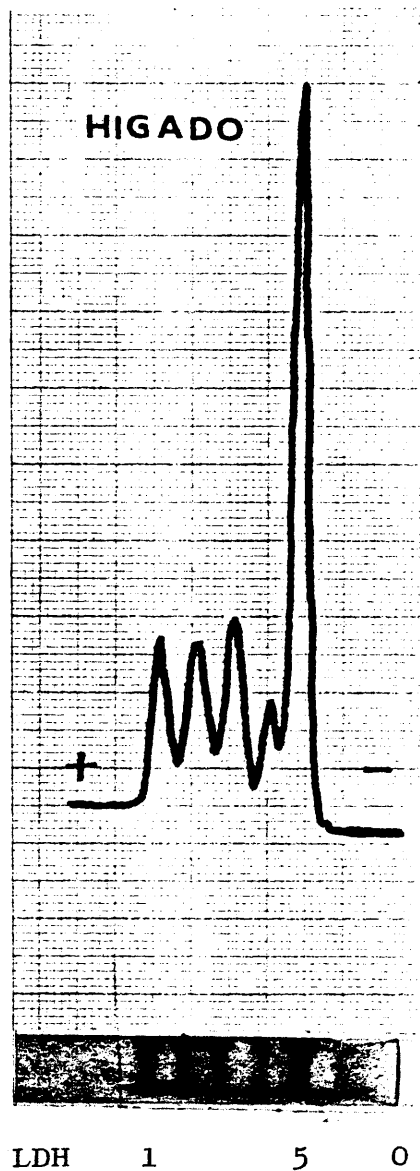
	CONTROLES	FRIO
<u>HIGADO</u>		
(nmoles NADH/min/ /mg tejido)	74 ± 7 (8)	79 ± 12 (8)
(µmoles NADH/min/ /mg proteína)	0,811 ± 0,121 (8)	0,804 ± 0,117 (8)
<u>CORAZON</u>		
(nmoles NADH/min/ /mg tejido)	290 ± 81 (7)	303 ± 41 (8)
(µmoles NADH/min/ /mg de proteína)	5,32 ± 1,13 (7)	4,12 ± 0,56 (8) *
<u>CEREBRO</u>		
(nmoles NADH/min/ /mg tejido)	56 ± 13 (6)	71 ± 5 (8) **
(µmoles NADH/min/ / mg proteína)	1,66 ± 0,21 (6)	1,46 ± 0,23 (8)

Los resultados se expresan como la media ± la desviación
típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo.

(*) Descenso significativo (p < 0,02)

(**) Aumento significativo (p < 0,02)



-Fig. 2a.- Electroferograma y curva densitométrica de las isoenzimas de LDH del hígado de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. (0: origen).

TABLA V

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS DE LDH(%) EN EL HIGADO DE ANIMALES ADULTOS (DISCOGLOSSUS PICTUS) SOMETIDOS A HIBERNACIÓN EXPERIMENTAL.

ISOENZIMAS (%)	CONTROLES (8)	FRIO (8)
LDH 1	14,36 \pm 1,28	12,78 \pm 1,44 ★
2	13,78 \pm 1,66	10,59 \pm 1,14 ★★
3	14,33 \pm 2,39	14,88 \pm 2,15
4	7,89 \pm 1,46	7,79 \pm 2,12
5	49,64 \pm 5,16	53,96 \pm 5,38
SUBUNIDADES (%)		
H	33,83 \pm 3,05	30,11 \pm 3,04 ★
M	66,17 \pm 3,05	69,89 \pm 3,04 ★★★

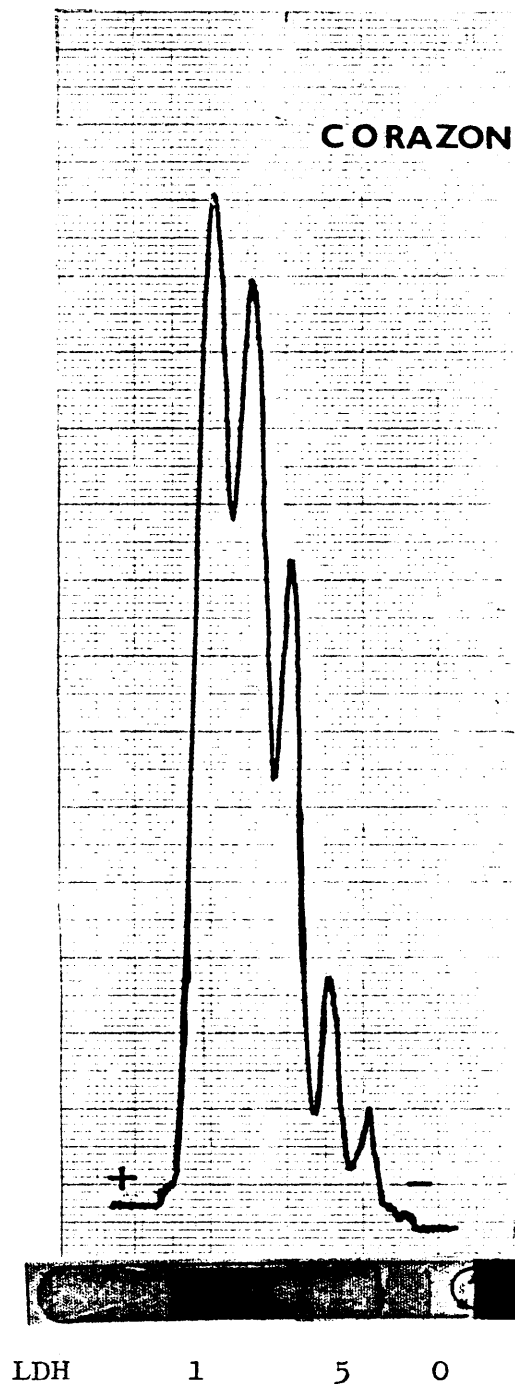
Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo

(★) Descenso significativo ($p < 0,05$)

(★★) Descenso significativo ($p < 0,01$)

(★★★) Aumento significativo ($p < 0,05$)



-Fig. 2b.- Electroferograma y curva densitométrica de las isoenzimas de LDH del corazón de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. 0: origen.

TABLA VI

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS DE LDH (%) EN TEJIDO CARDIACO DE DISCOGLOSSUS PICTUS ADULTOS SOMETIDOS A HIBERNACION EXPERIMENTAL.

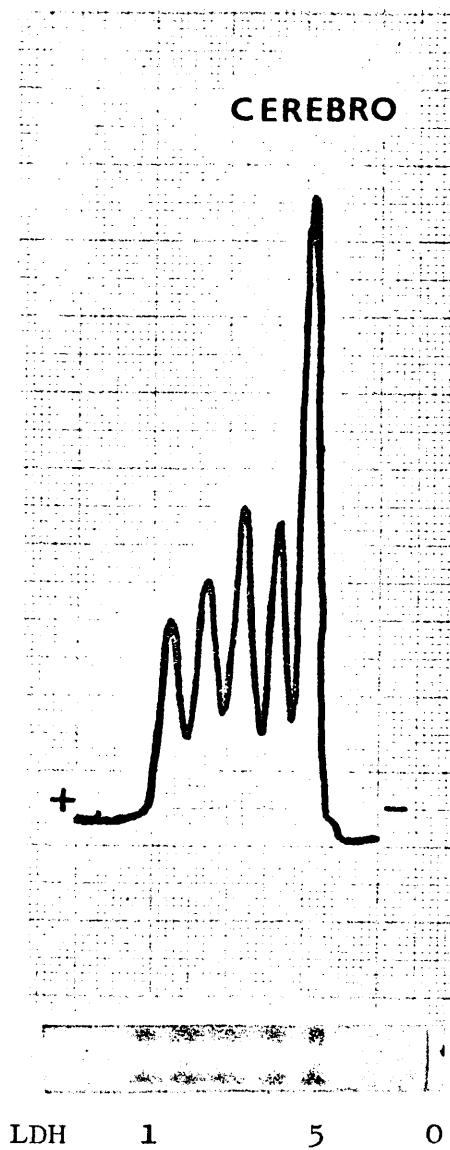
ISOENZIMAS (%)	CONTROLES(8)	FRIO(8)
LDH 1	38,16 \pm 3,84	36,13 \pm 1,26
2	33,63 \pm 2,38	27,73 \pm 0,93 ★
3	18,88 \pm 2,45	20,49 \pm 1,44
4	6,45 \pm 1,63	10,24 \pm 0,48 ★★
5	2,87 \pm 0,55	5,41 \pm 0,88 ★★
SUBUNIDADES (%)		
H	74,44 \pm 2,49	69,73 \pm 0,77 ★
M	25,56 \pm 2,49	30,27 \pm 0,77 ★★

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica.

Entre paréntesis en número de animales por grupo.

(★) Descenso significativo ($p < 0,001$)

(★★) Aumento significativo ($p < 0,001$)



-Fig. 3.- Electroferograma y curva densitométrica de las isoenzimas de LDH del cerebro de Discoglossus pictus pictus adulto. 0: origen.

TABLA VII

VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS DE LDH(%) EN CEREBRO DE DISCOGLOSSUS PICTUS ADULTOS SOMETIDOS A HIBERNACION EXPERIMENTAL

ISOENZIMAS (%)	CONTROLES(8)	FRIO (8)
LDH -1	16,09 \pm 1,96	16,05 \pm 1,51
2	17,20 \pm 1,20	17,73 \pm 1,28
3	23,39 \pm 1,80	25,52 \pm 1,30 (*)
4	19,27 \pm 1,55	18,99 \pm 2,03
5	24,05 \pm 3,64	21,71 \pm 1,87
SUBUNIDADES(%)		
H	45,50 \pm 2,46	46,86 \pm 2,05
M	54,50 \pm 2,46	53,14 \pm 2,05

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo

(*) aumento significativo ($p < 0,02$)

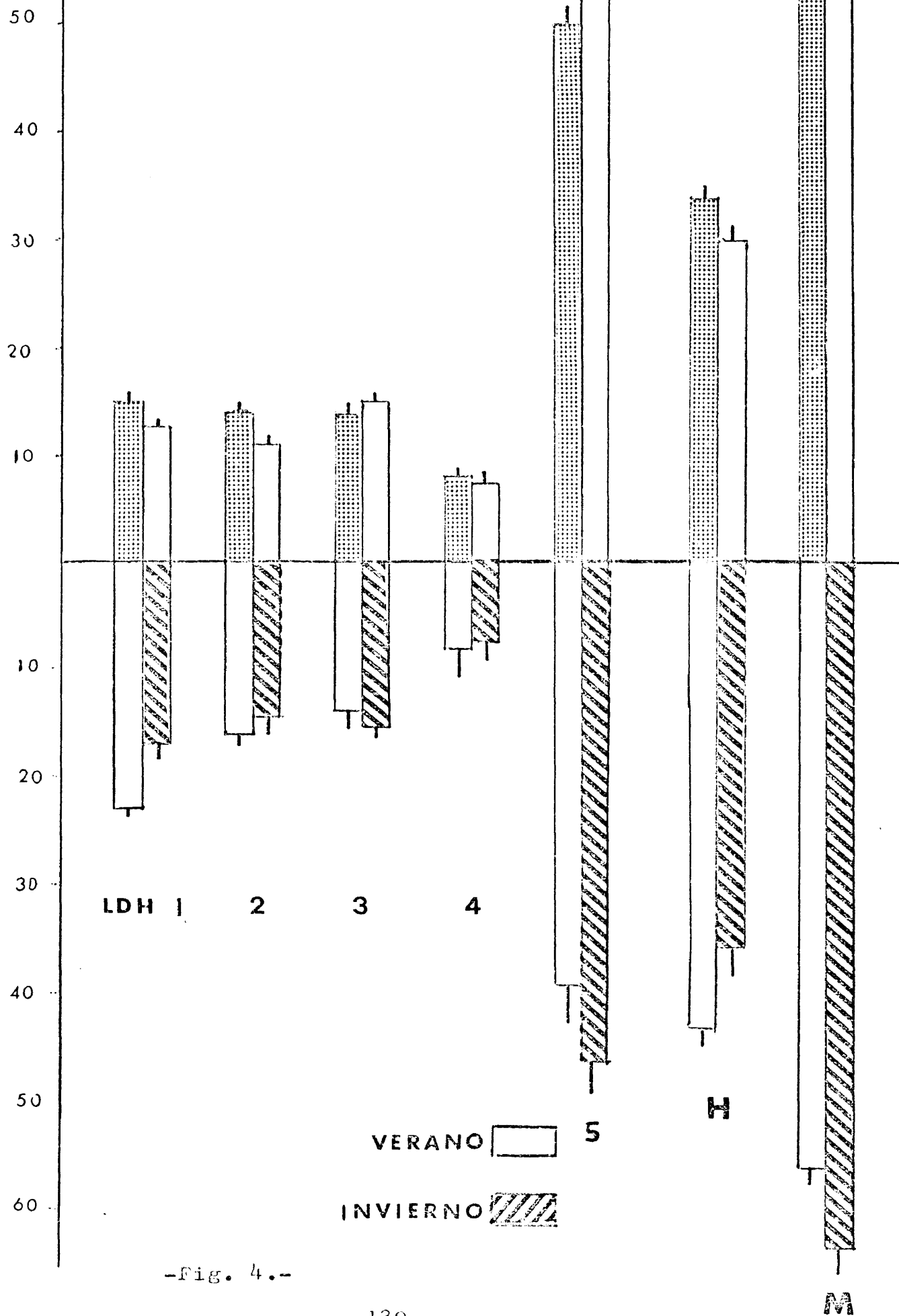
LDH del hígado (Fig. 2a), corazón (Fig. 2b) y cerebro - (Fig. 3) de hembras de D. pictus pictus variedad a -- manchas adultas. Se puede observar que el primer tejido muestra un predominio de LDH₅, el segundo una mayor proporción de isoenzimas anódicas (LDH₁ y LDH₂), y el tercero muestra un modelo intermedio de distribución de isoenzimas, con un ligero predominio de LDH₃ y LDH₅.

En las tablas V, VI y VII se exponen los datos correspondientes a las actividades relativas de las isoenzimas y subunidades de LDH de los animales adultos. En la tabla V se aprecia que con respecto al hígado se encontró: a) un aumento significativo ($0,05 > p > 0,02$) del porcentaje de subunidades M, de 66,17 en el grupo control de medio ambiente a 69,89% en el grupo de frío; y b) disminuciones significativas en el porcentaje de: LDH₁ ($0,05 > p > 0,02$), de 14,36 en el control a 12,78% en el grupo de frío; LDH₂ ($0,01 > p > 0,001$), de 13,78 a 10,59%; así como del porcentaje de subunidades H ($0,05 > p > 0,02$), pasando de un 33,83 en el grupo control a 30,11 en el de frío. Otras variaciones no significativas con la adaptación a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ fueron el descenso de LDH₄ y el aumento de LDH₃ y LDH₅. Estos resultados se pueden encontrar esquematizados en la parte superior de la figura 4.

Con respecto al corazón (Tabla VI), se observan las siguientes variaciones significativas del grupo control al de frío: aumento en el porcentaje de subunidades M ($0,001 > p$), de 25,56 a 30,27; LDH₅ ($0,001 > p$), de 2,87 a 5,41; y de LDH₄ ($0,001 > p$), de 6,45 a 10,24. Disminución de LDH₂ ($0,001 > p$), de 33,63 a 27,73; y de las subunidades H ($0,001 > p$), de 74,44 a 69,73. Otras variaciones no significativas fueron el aumento de LDH₃ y el descenso de LDH₁ (Ver parte superior de la figura 5).

-Figs. 4, 5 y 6.- Representación de las actividades relativas (%) de las isoenzimas (1-5) y de las subunidades (H y M) de LDH de hígado (Fig. 4), corazón (Fig. 5) y cerebro (Fig. 6) de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. Arriba: control (octubre) y adaptación experimental al frío ($8 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ayuno y obscuridad durante 5 meses. Abajo: adaptaciones estacionales.

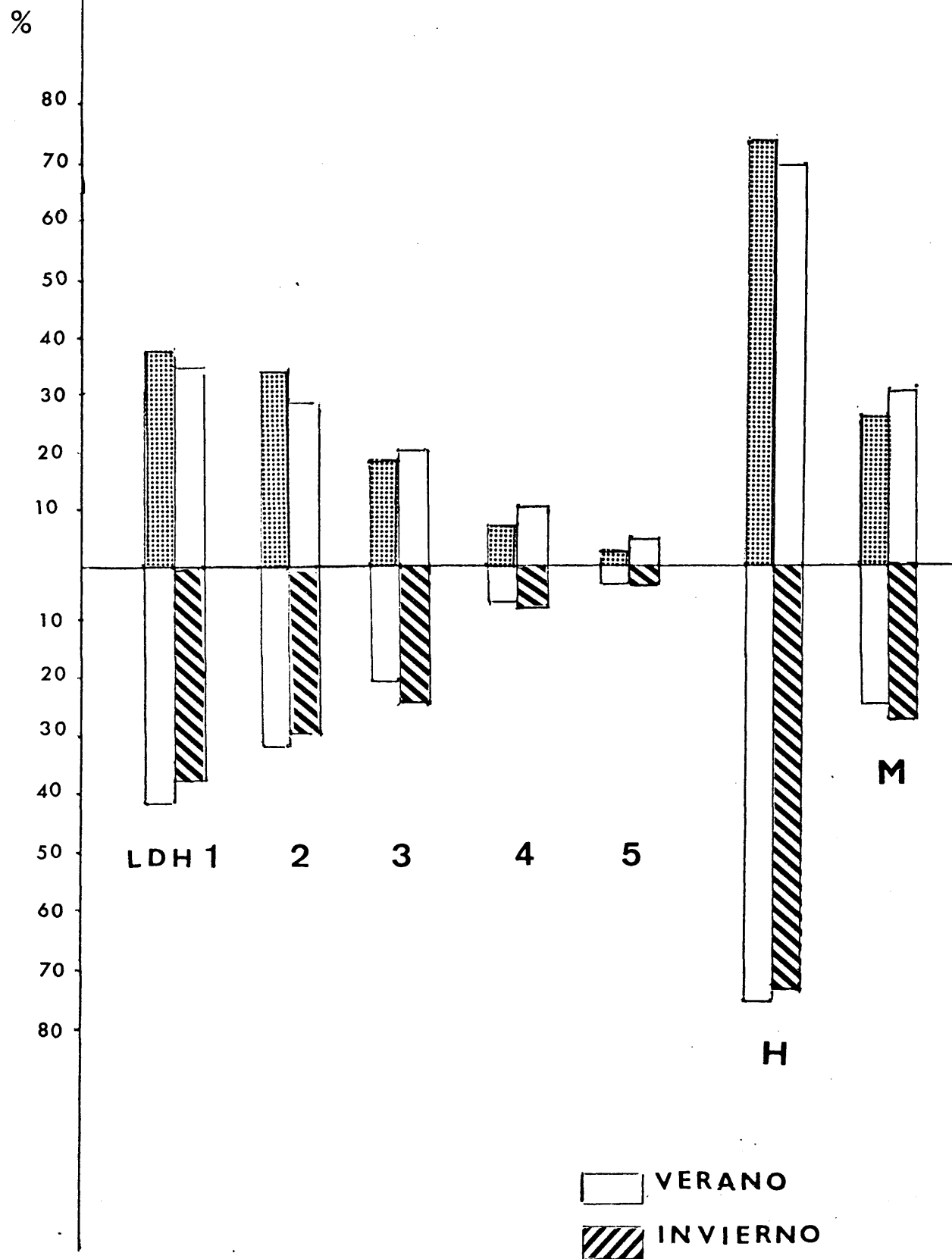
HIGADO



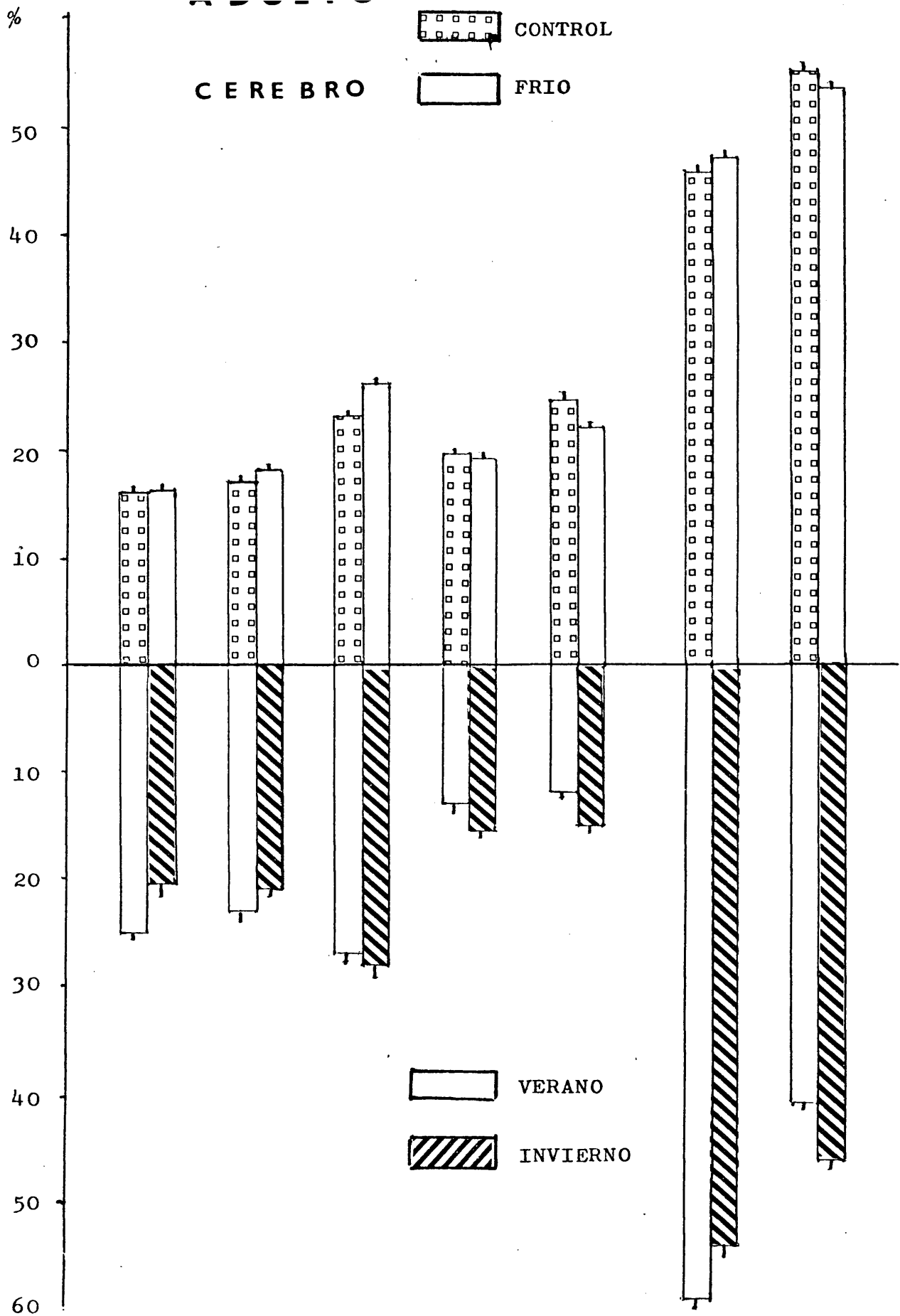
-Fig. 4.-

ADULTO

C O R A Z O N



-Fig. 5.-



-Fig.-6.

Con respecto al cerebro (Tabla VII), solo se encontró una variación significativa: el aumento de LDH_3 ($0,02 > p > 0,01$), de 23,39 a 25,52%, con la adaptación al frío. Las demás variaciones fueron: aumento de la isoenzima 2 y de las subunidades H y la disminución de las isoenzimas 1, 4 y 5 y de las subunidades M (Ver parte superior de la figura 6).

-B.-Influencia de la estación.-

-a.-Actividad específica por mg de tejido fresco.-

Los datos correspondientes a la actividad específica por mg de tejido fresco de este grupo de experimentos se encuentra en la tabla VIII. Los resultados correspondientes al hígado muestran un aumento significativo de esta actividad ($0,02 > p > 0,01$) en el invierno, de 67 a 84 nmoles de NADH oxidados por min -- por mg de tejido fresco. Con respecto al corazón, se observa un descenso no significativo de esta actividad. El cerebro, en cambio, muestra un aumento significativo ($0,02 > p > 0,01$), de 55 a 64 nmoles de NADH/min/mg de tejido, en el invierno (Ver parte inferior de la figura 7).

-b.-Actividad específica por mg de proteína.-

En la tabla VIII se encuentran también los datos correspondientes a la actividad específica por mg de proteína, expresados en μ moles de NADH oxidados -- por min por mg de proteína, de hígado, corazón y cerebro de este grupo de experimentos. Se observa que los animales de invierno muestran valores más bajos que los animales de verano, aunque en ningún caso resultaran significativas estas diferencias (Ver parte inferior de la figura 8).

-c.-Actividades relativas de las isoenzimas y de las subunidades.-

-i.-Heterogeneidad de la LDH_5 .-

En este grupo de experimentos si se detectó -

TABLA VIII

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LDH EN TEJIDOS DE DISCOGLO-
SSUS PICTUS ADULTO CAPTURADOS EN VERANO E INVIERNO.

	VERANO	INVIERNO
<u>HIGADO</u>		
(nmoles NADH/min/ /mg tejido)	68±9 (8)	84±12 (5)*
(µmoles NADH/min/ /mg proteina)	0,808±0,032 (8)	0,777±139 (6)
<u>CORAZON</u>		
(nmoles NADH/min/ /mg tejido)	359±38 (8)	316±61 (6)
(µmoles NADH/min/ /mg proteina)	4,57±0,37 (8)	4,23±0,76 (7)
<u>CEREBRO</u>		
(nmoles NADH/min/ /mg tejido)	55±6 (7)	64±6 (7)*
(µmoles NADH/min/ /mg proteina)	1,24±0,07 (7)	1,20±0,41 (6)

Los resultados se expresan como la media la desviación
típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo.

(*) Aumento significativo ($p < 0,02$).

-Figs. 7 y 8.- Representación de las actividades específicas (Fig. 7, por mg de tejido fresco; Fig. 8, por mg de proteína) de LDH del hígado (izquierda), corazón (centro) y cerebro (derecha) de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. Arriba: control y adaptación experimental al frío ($8 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ayuno y obscuridad; abajo: adaptaciones estacionales.

NADH/min/
mg tejido

400
300
200
100
100
200
300
400

CORAZON

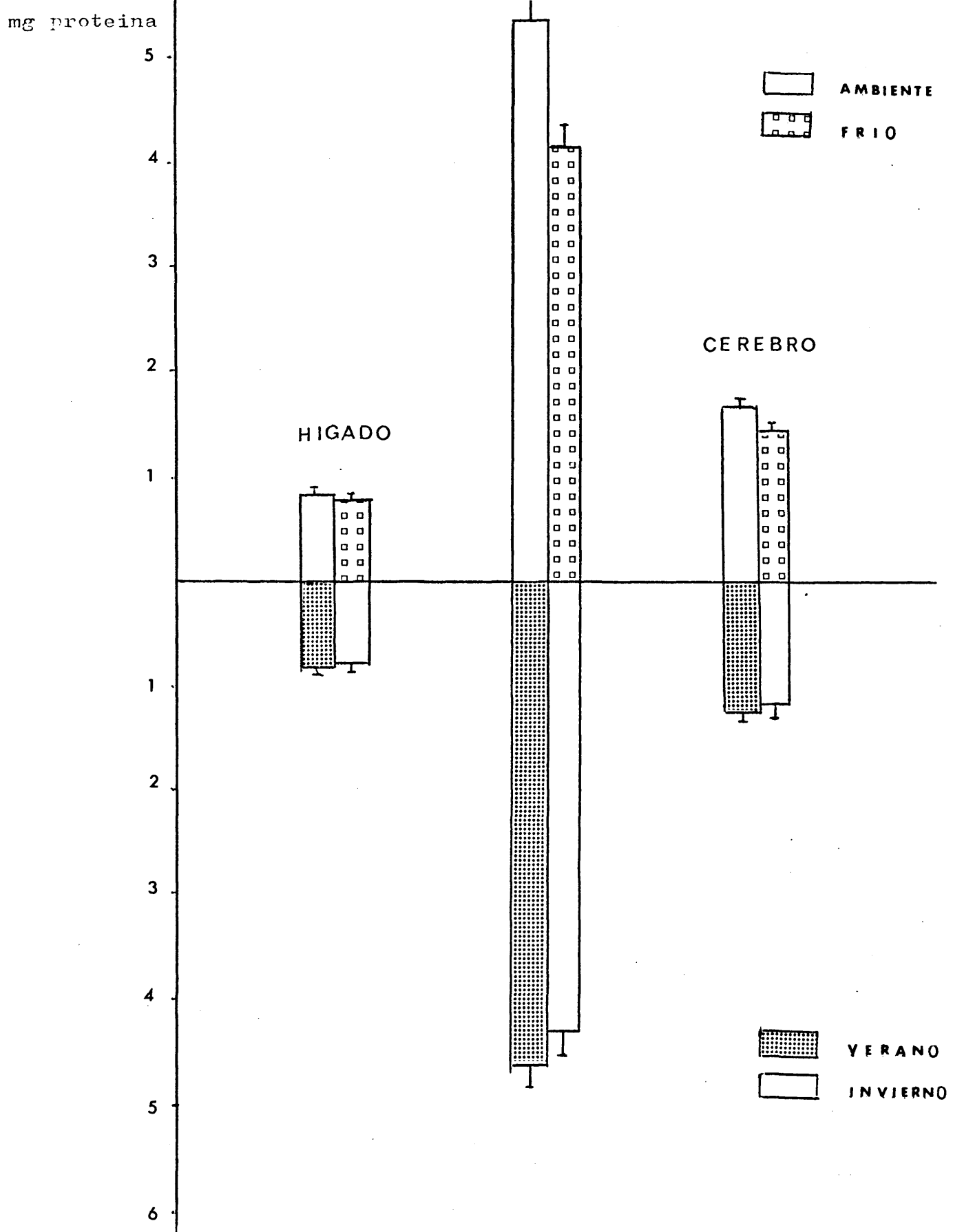
HIGADO

CEREBRO

ambiente
frío

verano
invierno

-Fig. 7.-



-Fig. 8.-

heterogeneidad con respecto a la LDH₅, encontrándose, de 8 animales utilizados como representativos de invierno, que 5 eran del tipo que se denominó "rápido" y 3 del tipo "intermedio"; en las hembras de verano se encontraron 3 animales del tipo "rápido", 3 del tipo intermedio y 2 del tipo "lento". Buscando un cierto grado de homología con los resultados de las actividades relativas del grupo de adaptación de animales adultos a las condiciones experimentales de frío, ayuno y oscuridad, se emplearon solo los datos correspondientes a los animales que mostraron un tipo de LDH₅ "rápido".

-ii.-Actividades relativas.-

Los resultados obtenidos con respecto a las actividades relativas de subunidades e isoenzimas se encuentran en las tablas IX, X y XI. En la primera de ellas se hallan los correspondientes al hígado, en donde se observa una disminución significativa ($0,01 > p > 0,001$) de la isoenzima 1 en el invierno, poseyendo un valor de 16,67%, frente a 22,69 del grupo de verano. Las demás variaciones: descenso de las isoenzimas 2 y 4 y de las subunidades H, y aumento de las 3 y 5 y de las subunidades M en el invierno, no son significativas (Ver parte inferior de la figura 4).

En la tabla X se muestran los valores medios de los resultados obtenidos en el corazón. Solo fué significativo ($0,05 > p > 0,02$) el aumento de LDH₃, de 19,69 a 23,85%, con el invierno. También se observa una disminución en las isoenzimas 1, 2 y 5 y en las subunidades H, con un aumento de LDH₄ y las subunidades M en los animales de invierno, pero son cambios no significativos estadísticamente (Ver parte inferior de la figura 5).

Con respecto al cerebro (Tabla XI), se encontró que los animales de invierno muestran los siguientes

TABLA IX

ACTIVIDAD RELATIVA (%) DE LAS ISOENZIMAS DE LDH DE HIGADO
DE DISCOGLOSSUS PICTUS CAPTURADOS EN VERANO E INVIERNO

ISOENZIMAS(%)	JUNIO(3)	DICIEMBRE(4)
LDH -1	22,69 \pm 0,68	16,67 \pm 2,40 (*)
2	15,73 \pm 1,11	13,83 \pm 3,15
3	13,99 \pm 2,47	15,10 \pm 1,11
4	8,42 \pm 3,21	7,93 \pm 2,44
5	39,17 \pm 6,39	46,47 \pm 6,95
SUBUNIDADES(%)		
H	43,59 \pm 2,52	36,58 \pm 4,60
M	56,41 \pm 2,52	63,42 \pm 4,60

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo

(*) Disminución significativa ($p < 0,01$)

TABLA X

ACTIVIDAD RELATIVA (%) DE LAS ISOENZIMAS DE LDH DEL TEJIDO CARDIACO DE DISCOGLOSSUS PICTUS CAPTURADOS EN VERANO Y EN INVIERNO.

ISOENZIMAS (%)	JUNIO (3)	DICIEMBRE(4)
LDH-1	39,88 ± 4,74	36,39 ± 2,84
2	31,58 ± 2,55	30,19 ± 2,35
3	19,69 ± 1,52	23,85 ± 2,25 *
4	6,80 ± 1,41	7,57 ± 1,98
5	2,05 ± 0,38	2,00 ± 0,64
SUBUNIDADES(%)		
H	75,11 ± 2,47	72,85 ± 1,19
M	24,89 ± 2,47	27,15 ± 1,19

Los resultados se expresan como la media ± la desviación típica

Entre paréntesis el número de animales por grupo.

(*) Aumento significativo ($p < 0,05$).

TABLA XI

ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS DE LDH DE CEREBRO DE
DISCOGLOSSUS PICTUS (OTTH.) ADULTOS CAPTURADOS EN VERANO
E INVIERNO.

ISOENZIMAS (%)	JUNIO (3)	DICIEMBRE (5)
LDH 1	25,05 \pm 1,01	20,53 \pm 2,87*
2	23,28 \pm 1,88	20,88 \pm 2,19
3	26,79 \pm 0,77	28,28 \pm 2,84
4	13,16 \pm 1,84	15,29 \pm 1,40
5	11,72 \pm 0,69	15,02 \pm 1,44* *
SUBUNIDADES(%)		
H	59,19 \pm 1,58	54,15 \pm 2,61*
M	40,81 \pm 1,58	45,85 \pm 2,61***

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación
típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo

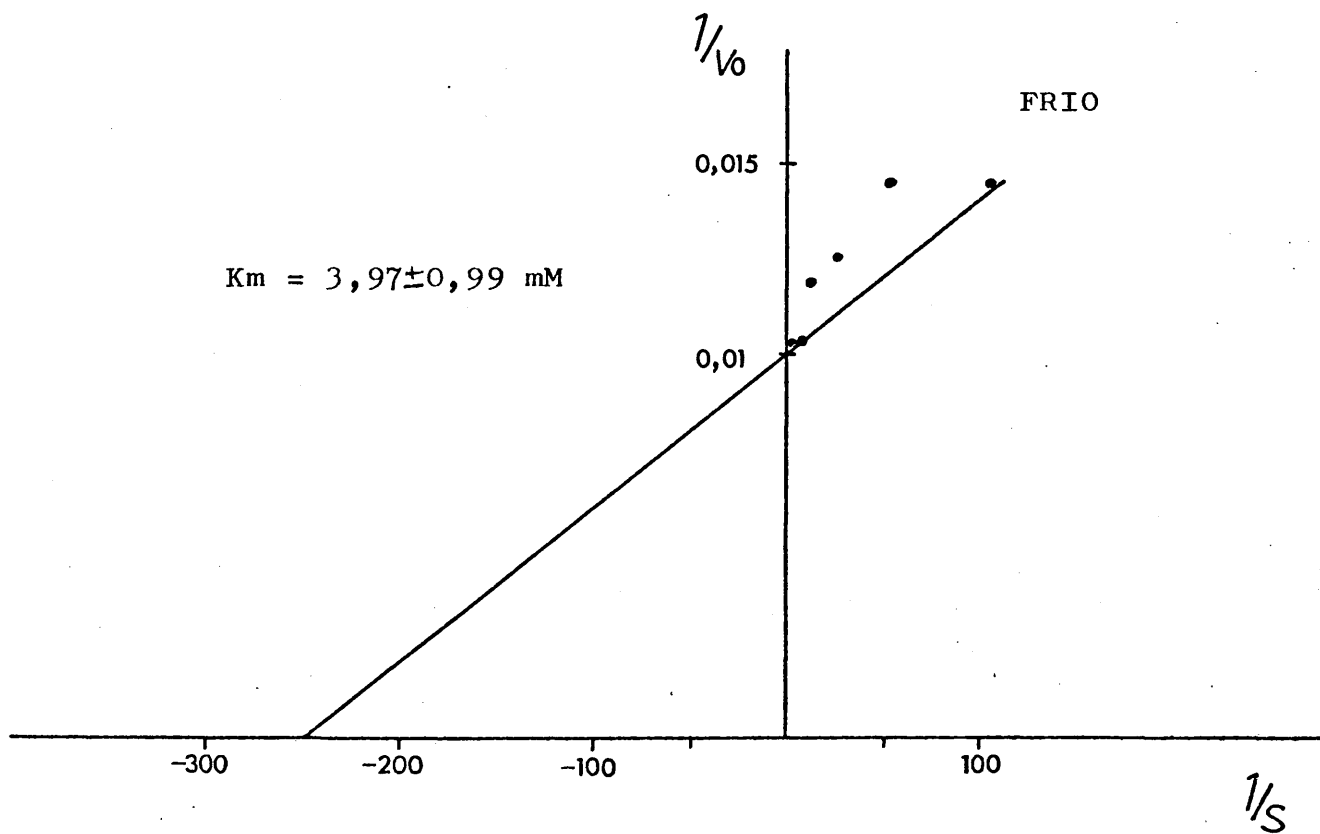
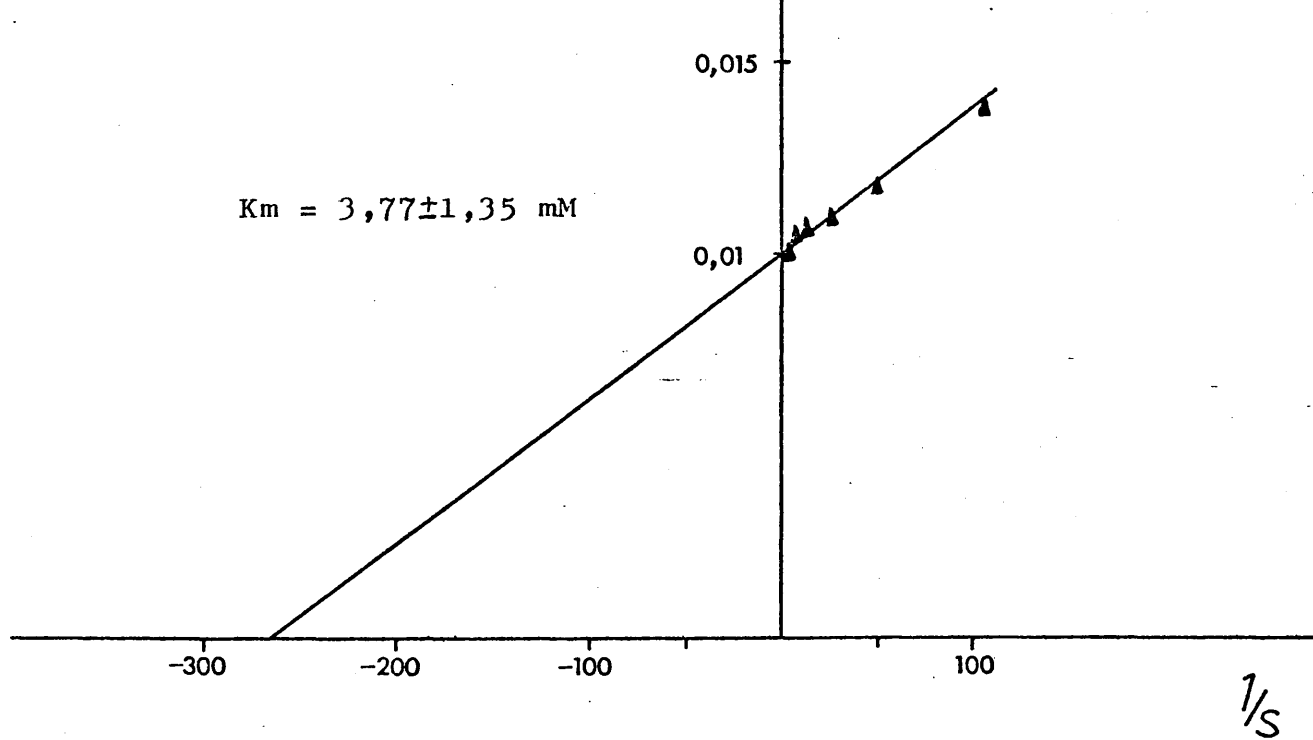
(*) Descenso significativo ($p < 0,05$). (**) Aumento sig-
nificativo ($p < 0,02$). (***) aumento significativo ($p < 0,05$)

tes cambios frente a los de verano: a) significativos: disminución de las isoenzimas 1, de 25,05 a 20,53% -- ($0,05 > p > 0,02$), y de las subunidades H, de 59,19 a -- 54,15% ($0,05 > p > 0,02$); aumentos de la isoenzima 5, de 11,72 a 15,02% ($0,02 > p > 0,01$) y de las subunidades M, de 40,81 a 45,85% ($0,05 > p > 0,02$). b) no significativos: disminución de LDH₂ y aumento de las isoenzimas 3 y 4 (Ver parte inferior de la figura 6).

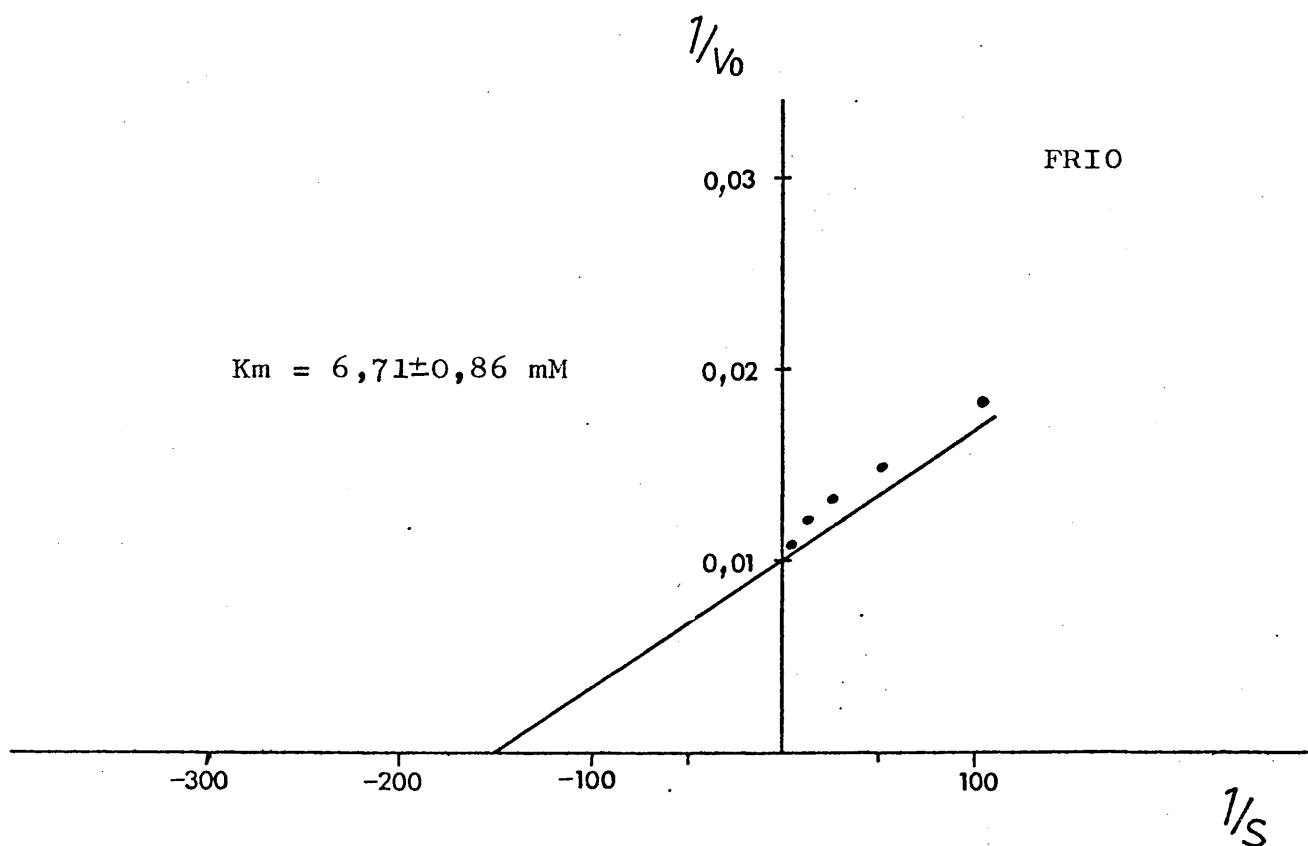
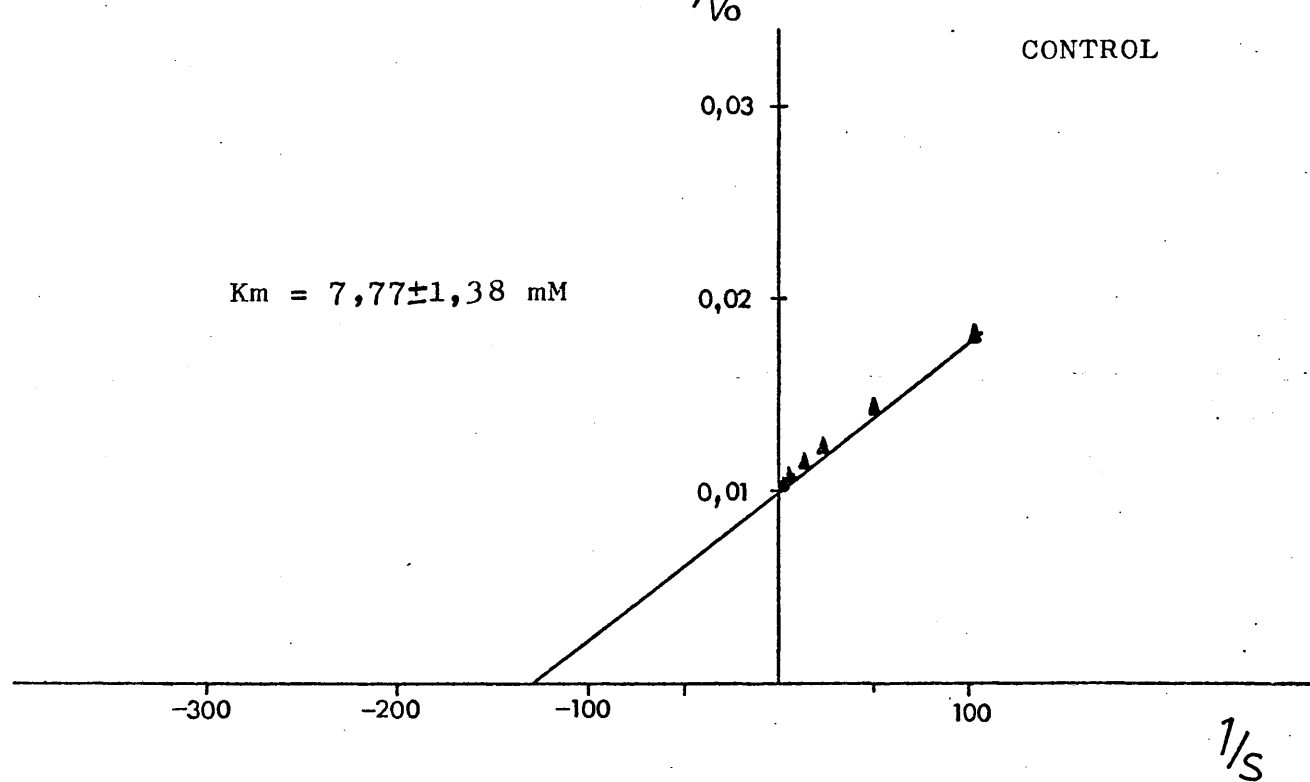
-C.-Km de las isoenzimas para el lactato.-

Los datos referentes a la constante de Michaelis-Menten de las isoenzimas de LDH de D. pictus pictus, con respecto al lactato, se encuentran en la tabla XII. De estos datos, obtenidos a partir de extractos de ovario, conviene destacar que cada uno de ellos es la media de una experiencia doble sobre el mismo sobrenadante. De la comparación de las medias totales se desprende que no hay diferencias significativas entre los grupos control y frío. Se observa un incremento de la Km de LDH₁ y un descenso de la de las restantes isoenzimas, paralelos a la adaptación al frío. -- También es de destacar que no hay cambios en el orden creciente del valor de la Km, la cual presenta su valor más bajo en la LDH₁ y el más alto en la LDH₅, siendo intermedios, de menor a mayor, los de las isoenzimas 2, 3 y 4. Estos valores oscilan entre 3-4 y 14,5 mM de lactato (Figs. 9, 10, 11, 12, 13 y 14).

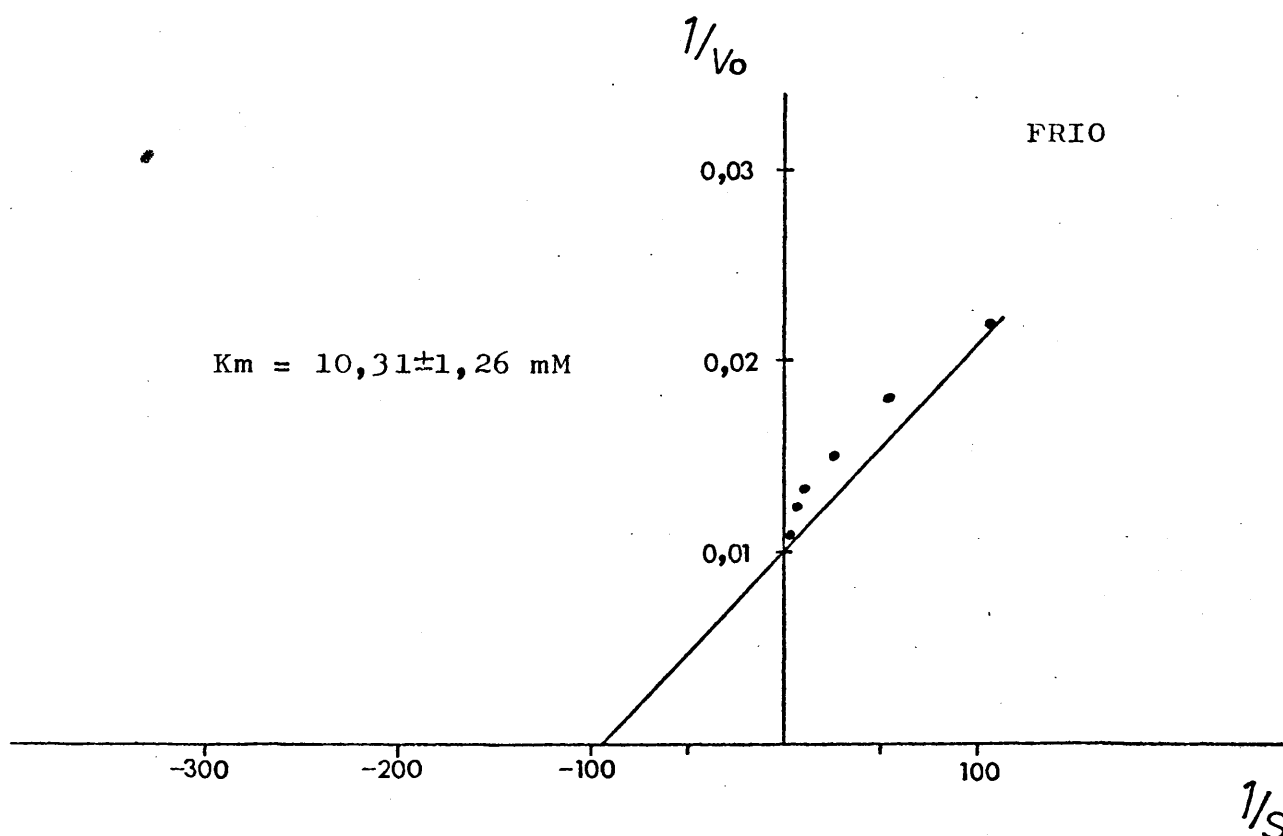
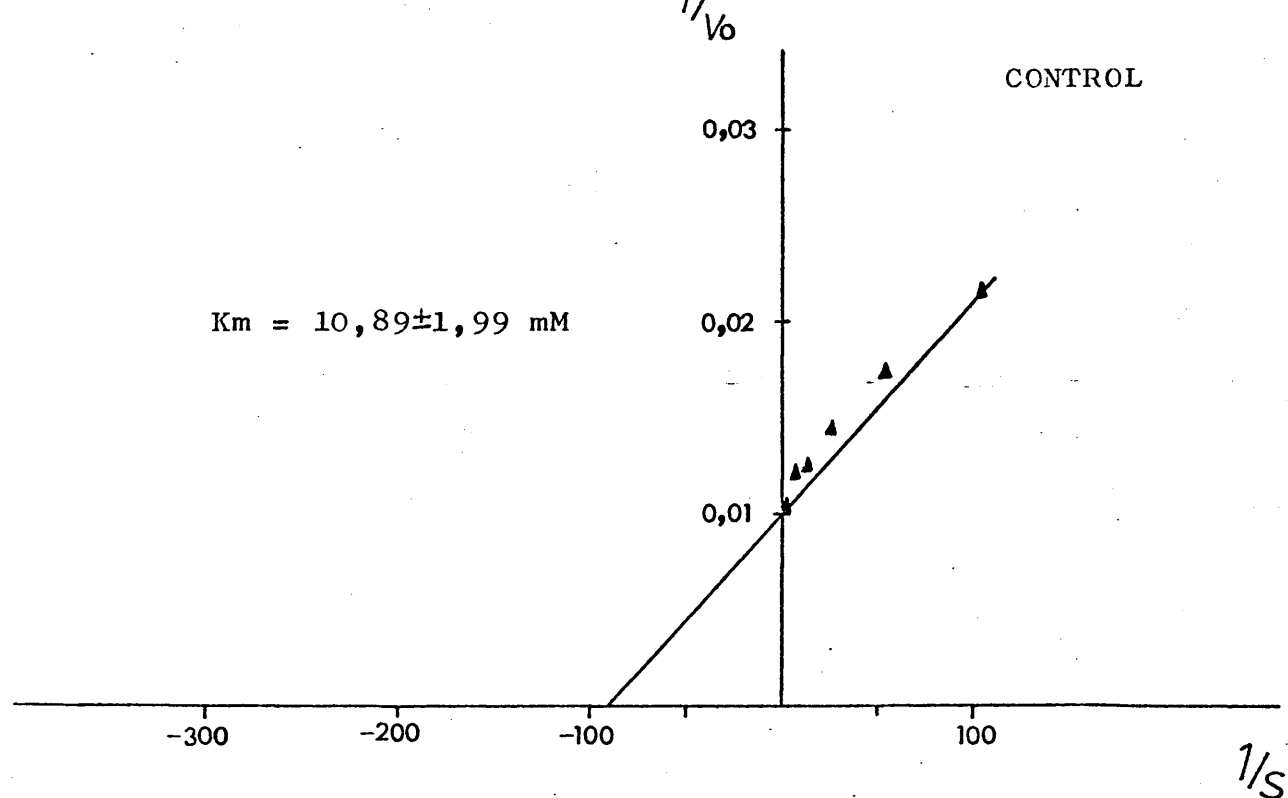
Debido a que, como se decía más arriba, no hay diferencias significativas entre los valores del grupo control y los del de frío, y a que la velocidad electroforética de las isoenzimas no variaba substancialmente, se supuso que las isoenzimas correspondientes de cada grupo eran la misma proteína, por lo que se obtuvo la media del conjunto de datos de cada isoenzima, sin atender al grupo al que pertenecían. Los resultados fueron: LDH₁ 3,86; LDH₂ 7,37; LDH₃ 10,67; LDH₄ 13,01 y LDH₅ 14,54 mM de lactato.



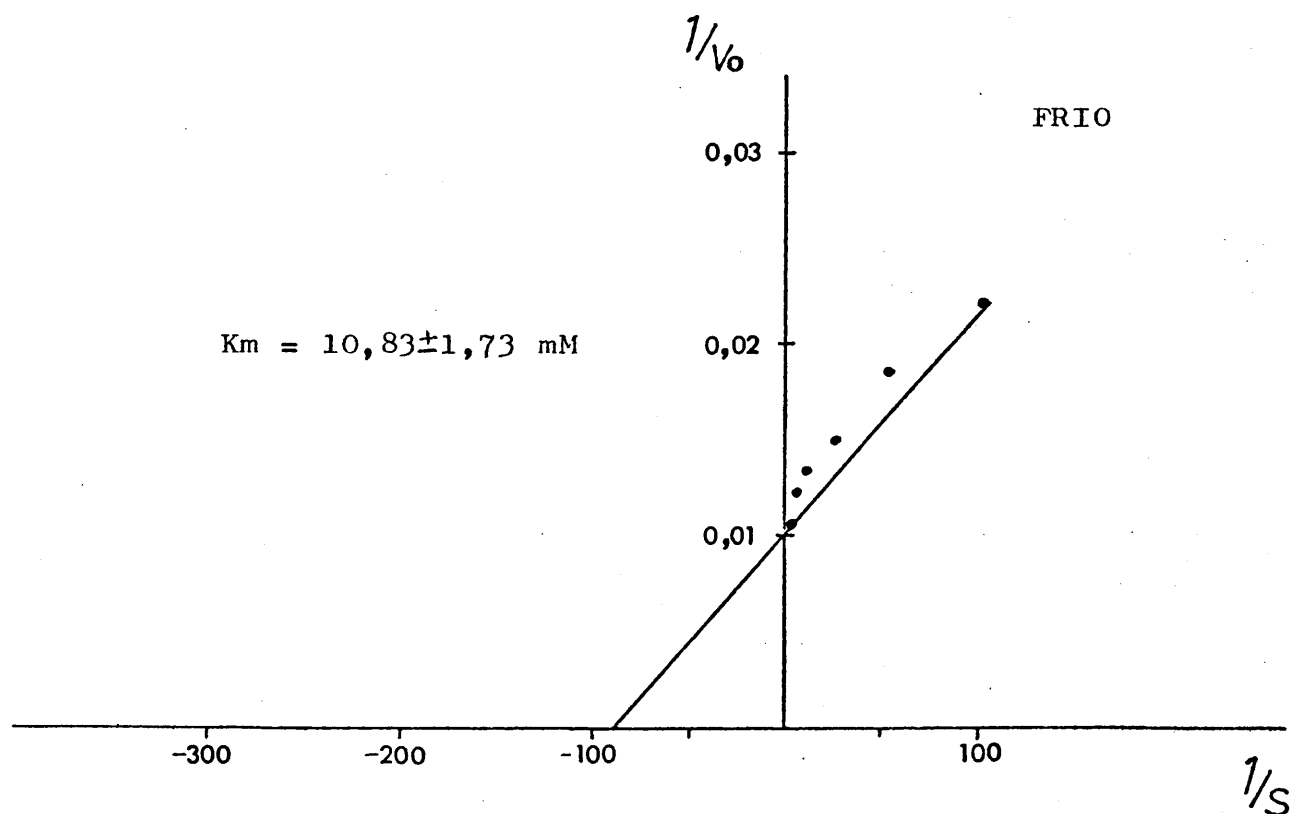
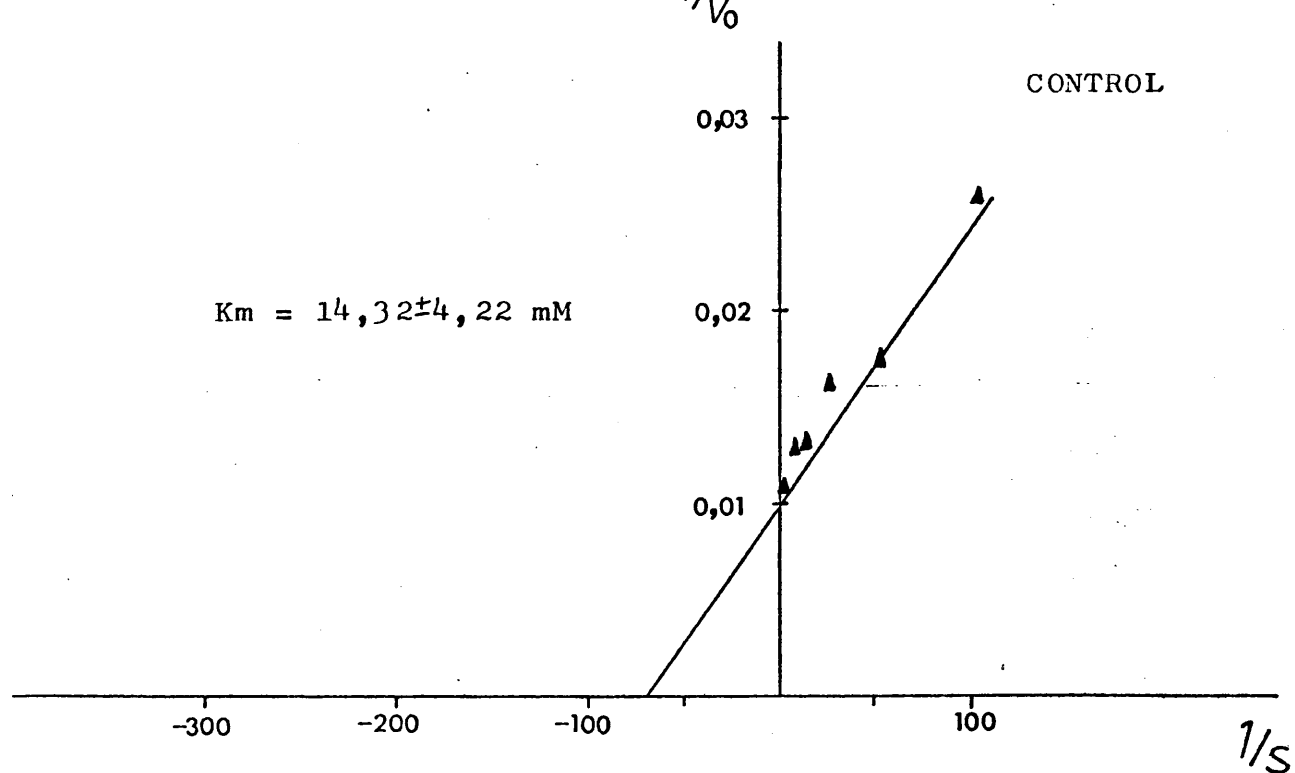
-Fig. 9.-Representación de Lineweaver-Burk de LDH_1 de ovario de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. v_0 : % de actividad (intensidad de color); s : M de lactato.



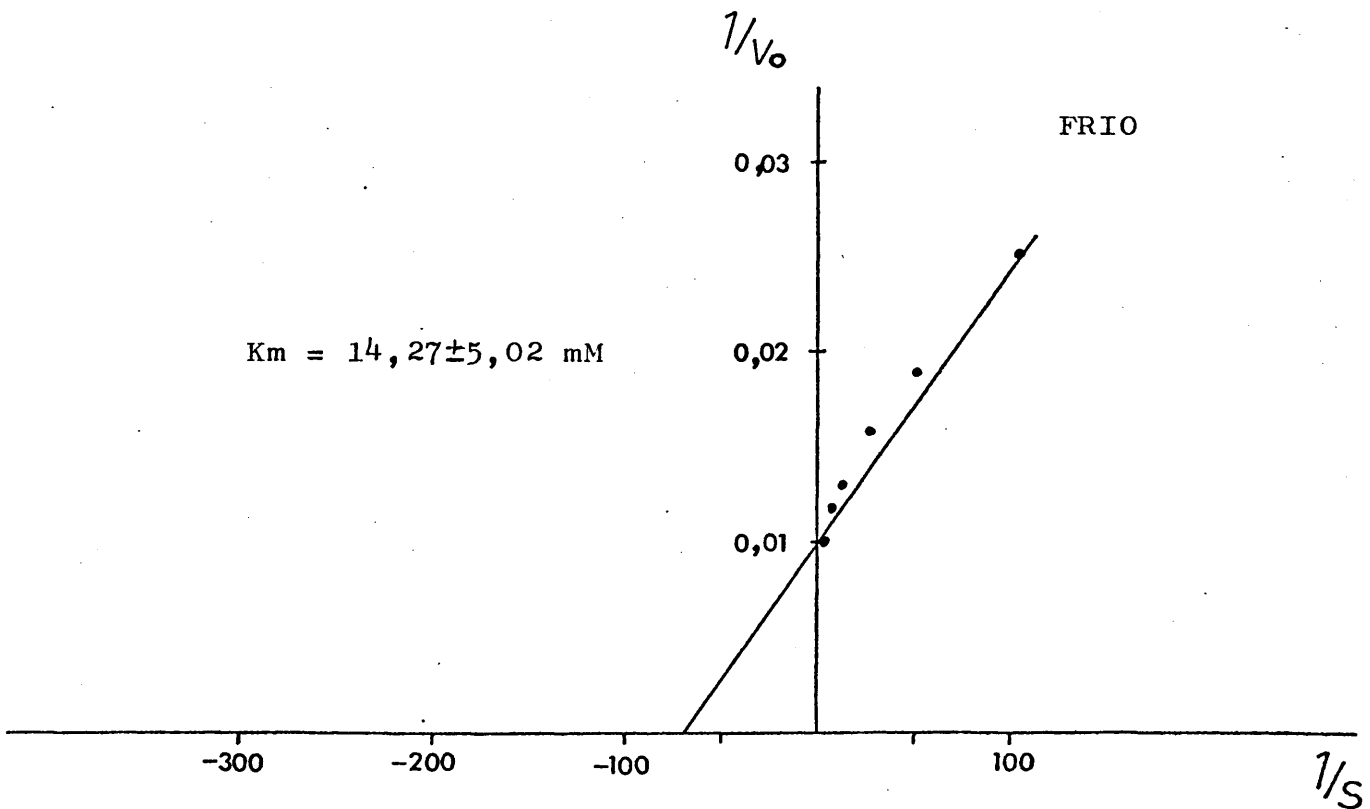
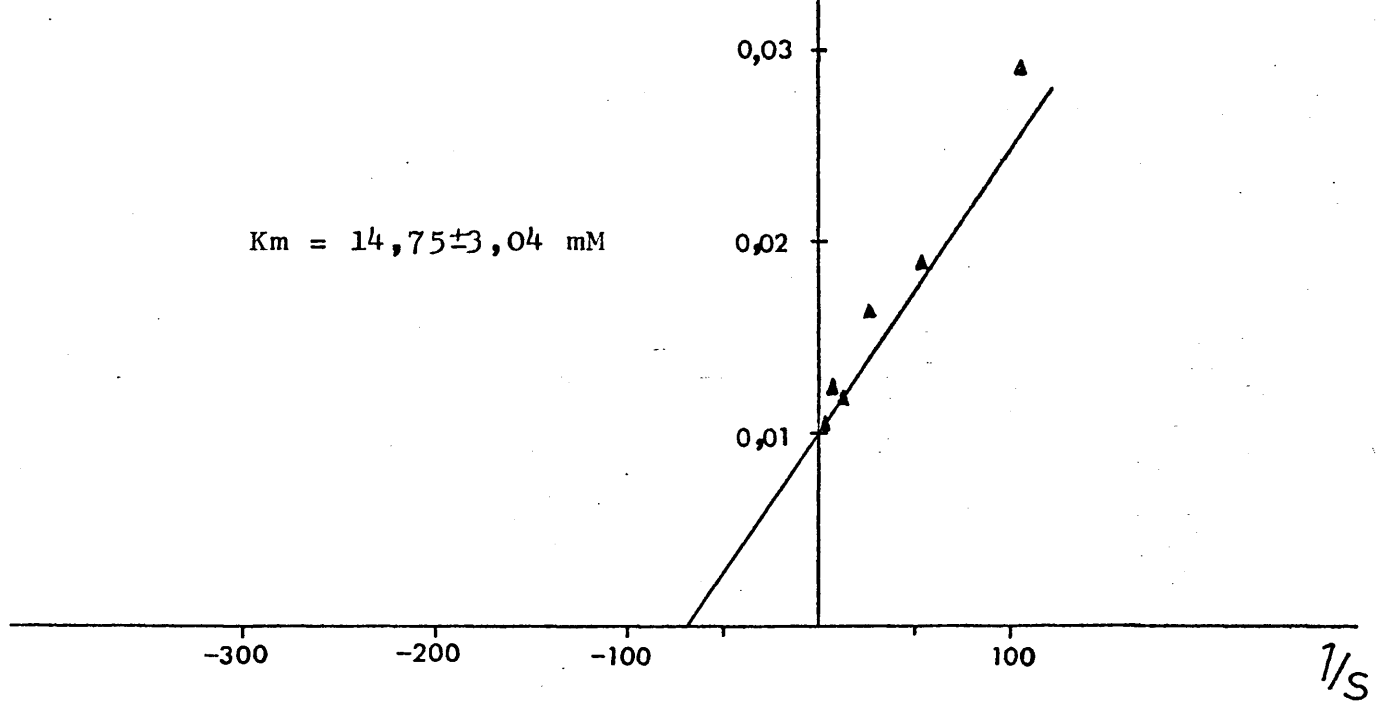
-Fig. 10.-Representación de Lineweaver-Burk de LDH_2 de ovario de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. v_0 : % de actividad (intensidad de color); s : M de lactato.



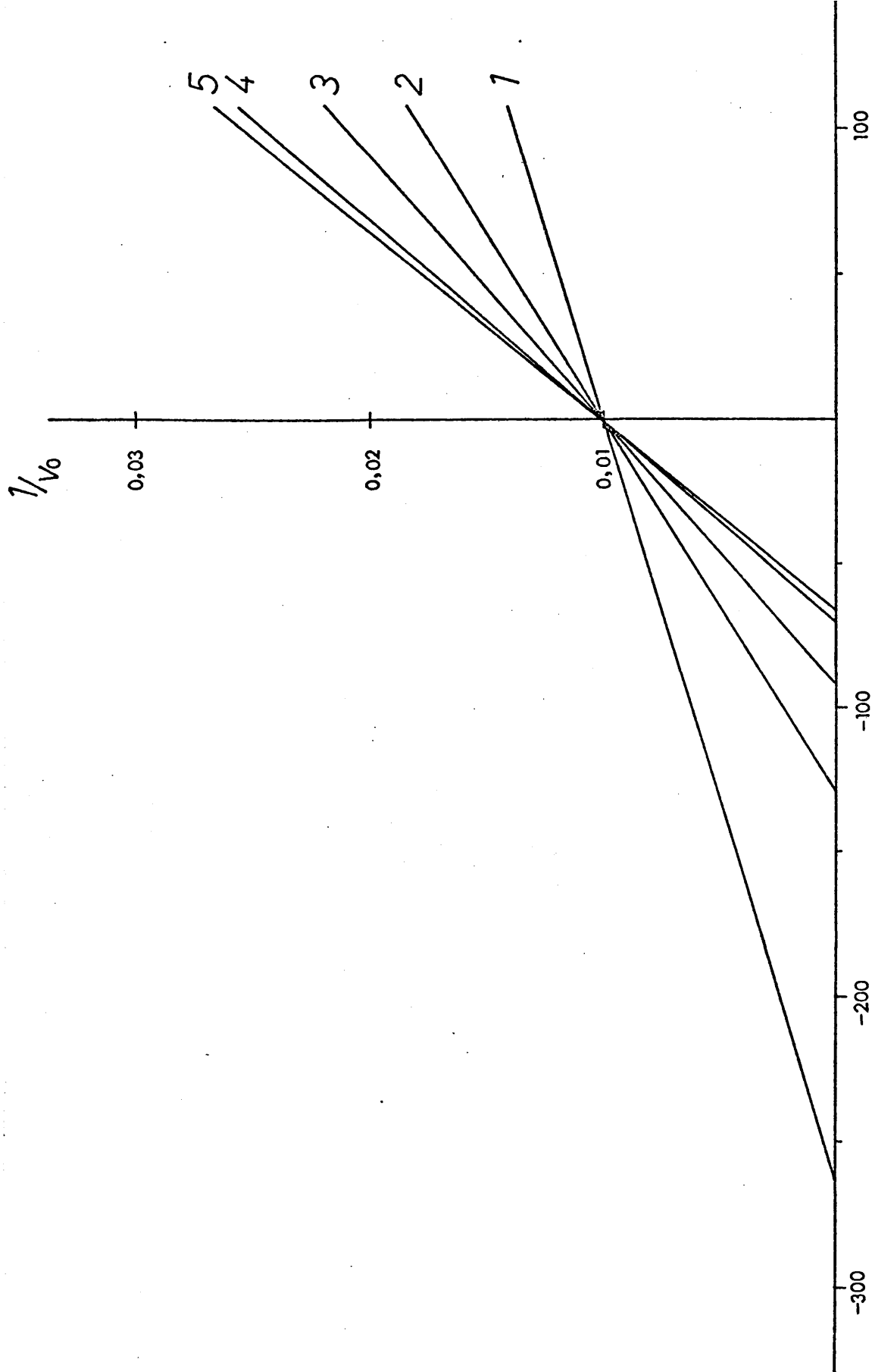
-Fig. 11.-Representación de Lineweaver-Burk de LDH₃ de ovario de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. v₀: % de actividad (intensidad de color); s: M de lactato.



-Fig. 12.-Representación de Lineweaver-Burk de LDH_4 de ovario de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. v_0 : % de actividad (intensidad de color); s : M de lactato.



-Fig. 13.-Representación de Lineweaver-Burk de LDH_5 de ovario de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas adulto. v_0 : % de actividad (intensidad de color); s : M de lactato.



-Fig. 14.-Representación de Lineweaver-Burk de las isoenzimas de LDH de ovario de Discoglossus pictus variedad a manchas adulto. Controles. v_0 : % de actividad (intensidad de color); s: M de lactato.

TABLA XII

VALORES DE LA Km PARA LACTATO (mm) DE LAS ISOENZIMAS
DE LDH EN EL OVARIO DE DISCOGLOSSUS PICTUS ADULTOS SOMETI-
DOS A HIBERNACION EXPERIMENTAL.

	CONTROLES (5)	FRIO 5 MESES (3)
LDH- 1	3,77 \pm 1,35	3,97 \pm 0,99
2	7,77 \pm 1,38	6,71 \pm 0,86
3	10,89 \pm 1,99	10,31 \pm 1,26
4	14,32 \pm 4,22	10,83 \pm 1,73
5	14,75 \pm 3,04	14,27 \pm 5,02

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación
típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo

Estadísticamente no existen diferencias significativas.

-2.-Estado 33 del desarrollo.-

-A.-Adaptación al frío.-

En este apartado se presentan dos series de datos correspondientes a dos grandes grupos de experimentos: el nº1, realizado con las puestas nº 1 y 2, y el nº2, realizado con la puesta nº3. La diferencia entre ambas radica, además de en el tiempo en que se realizaron, en la movilidad electroforética de la LDH₅, dependiente, al parecer, de variaciones en la estructura de la subunidad M. Así, las puestas nº1 y 2 resultaron ser del tipo de LDH₅ "rápido" (llamado también subunidad M rápida), y en la puesta nº3 se detectaron los tres tipos ya descritos, rápido, intermedio y lento, de forma que, para la obtención de los datos de las actividades relativas del experimento nº2, se contó únicamente con los zimogramas que mostraban una LDH₅ intermedia (también denominada subunidad M híbrida) para comprobar si el tipo de LDH₅ influye o no en la adaptación al frío, además de que este grupo de animales resultó más abundante. La diferencia entre los tipos rápido e intermedio se ha comprobado estadísticamente, de forma que las actividades relativas de los dos grupos controles que se expondrán a continuación, resultan significativamente distintas, de forma que los controles del experimento nº2 tienen mayor porcentaje de subunidades M.

-a.-Experimento nº1.-

-i.-Actividad total.-

Los datos correspondientes a la actividad total de este grupo de experimentos se pueden ver en la tabla XIII. Se observa que la actividad es mayor en los grupos de frío que en el control. Esta diferencia es significativa ($0,01 > p > 0,001$) entre este último grupo y el de frío de 11 días, pasando de 867 nmoles de NADH oxidados por min por animal en el control a 1191 en el de frío. En el grupo de frío de 30 días, la actividad es significativamente mayor ($0,05 > p > 0,02$) que la

ACTIVIDADES TOTAL Y ESPECIFICA DE LDH (SUBUNIDAD M RAPIDA) EN
DISCOGLOSSUS PICTUS EN PREMETAMORFOSIS (ESTADO 33) ADAPTADOS
 A BAJAS TEMPERATURAS

	CONTROLES (7)	FRIO 11 DIAS (8)	FRIO 30 d. (7)	FRIO 60 d. (7)
ACT. TOTAL				
(nmoles NADH/ /min/animal	867 ± 151	1143 ± 174**	1069 ± 141***	1255 ± 330****
ACT. ESPEC.				
(µmoles NADH/ /min/mg prot.)	1.063 ± 140	1582 ± 247*	1311 ± 207****	1492 ± 169*

Los resultados se expresan como la media ± la desviación tí-
 pica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo

(*) aumento significativo ($p < 0,001$). (**) aumento significativ
 tivo ($p < 0,01$). (***) aumento significativo ($p < 0,05$). (****) aumen-
 to significativo ($p < 0,02$).

del control, mostrando un valor de 1069 nmoles de NADH; por otro lado, es menor que la del grupo de frío de 11 días, pero tampoco es una diferencia significativa. - El grupo de frío de 60 días exhibe una actividad total mayor que los otros tres grupos, aunque esta diferencia solo resulte significativa ($0,02 > p > 0,01$) con respecto al grupo control, teniendo este grupo experimental una actividad de 1255 nmoles NADH/min/animal.

-ii.-Actividad específica.-

Los datos correspondientes a la actividad específica, expresada en nmoles de NADH oxidados por minuto por mg de proteína del sobrenadante, se encuentran también en la tabla XIII. Se puede observar que el valor más alto, 1582, lo exhibe el grupo de frío de 11 días, y el más bajo, 1064, el grupo control, -- siendo significativa la diferencia entre ambos ($0,001 > p$). El grupo de frío de 30 días mostró un valor de 1312, el cual es significativamente superior ($0,02 > p > 0,01$) al control y significativamente inferior ($0,05 > p > 0,02$) al grupo de frío de 11 días. La actividad específica del grupo de frío de 60 días fue de 1493 nmoles, valor que es significativamente mayor ($0,001 > p$) que el del grupo control, si bien es menor que el del grupo de frío de 11 días y mayor que el del de frío de 30 días, aunque estas diferencias últimas no resultara significativas. En resumen, la actividad específica resultó significativamente mayor en los animales adaptados a $8 \pm 2^\circ\text{C}$, si bien no se observó un aumento paralelo al tiempo de adaptación.

-iii.-Actividades relativas de las isoenzimas y de las subunidades.-

1.-Heterogeneidad de la LDH₅.-

Como se ha indicado ya en el apartado IV.2.A, las puestas nº 1 y 2, pertenecientes al grupo de experimentos nº1, resultaron homogéneas para el tipo de -

LDH₅ rápido, correspondiente, probablemente, a un tipo de subunidad M denominado también aquí rápido.

11.-Actividades relativas.-

Los resultados obtenidos a cerca del modelo de isoenzimas de LDH en este experimento, se encuentran detallados en la tabla XIV. Los cambios que se observaron en los animales adaptados al frío durante 11 días con respecto al control son los siguientes: aumento significativo de las isoenzimas 4 ($0,01 > p > 0,001$), --- 15,62 frente a 12,39% en el control; 5 ($0,01 > p > 0,001$), de 9,85 en el control a 14,29% en el grupo de frío; y del porcentaje de subunidades M ($0,001 > p$), 40,45 frente a 32,85% del control. Por otro lado, son también significativos los siguientes descensos: de LDH₁ --- ($0,001 > p$), de 42,14 a 31,93%, y de las subunidades H ($0,001 > p$), de 67,15 a 59,55%. Los aumentos de las isoenzimas 2 y 3 no resultaron significativos.

De la comparación del grupo adaptado al frío durante 30 días con el grupo control, se deduce que:

a) hay un aumento significativo de las isoenzimas 3 - ($0,05 > p > 0,02$), de 19,21 a 21,83%; 4 ($0,001 > p$), de --- 12,39 a 16,57%; y de la 5 ($0,01 > p > 0,001$), de 9,85 a --- 14,42%; y del porcentaje de subunidades M ($0,001 > p$), 32,85 a 41,85. b) Hay, además, disminución significativa de LDH₁ ($0,001 > p$), de 42,14 a 30,80%, y de las subunidades H ($0,001 > p$), de 67,15 a 58,15%. El descenso de LDH₂ no resultó significativo. La comparación con el grupo de frío de 11 días, dió como resultado que, en el grupo de frío de 30 días, disminuye significativamente la LDH₂ ($0,02 > p > 0,01$), pasando de 18,52 a 16,38%, mientras que el descenso de LDH₁ y de las subunidades H, y el aumento de las isoenzimas 3, 4 y 5 y de las subunidades M, no resultaron significativos.

En la comparación del grupo adaptado al frío

TABLA XIV

CAMBIO EN LA ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS (%) DE LDH EN LARVAS AL ESTADO 33 DE DISCOGLOSSUS PICTUS (SUBUNIDAD M RAPIDA) SOMETIDAS A BAJAS TEMPERATURAS ($8 \pm 2^\circ\text{C}$).

ISOENZIMAS (%)	CONTROLES (7)	FRIO 11 DIAS (8)		FRIO 30 DIAS (7)		FRIO 60 DIAS (7)	
LDH- 1	42,14 \pm 1,3,46	31,93 \pm 4,83 *	30,80 \pm 1,83	30,50 \pm 4,30 *			
2	16,41 \pm 3,50	18,52 \pm 1,83	16,38 \pm 1,13	14,50 \pm 1,53			
3	19,21 \pm 2,71	19,64 \pm 3,04	21,83 \pm 1,17 ***	22,62 \pm 2,85 ****			
4	12,39 \pm 0,79	15,62 \pm 2,48 **	16,57 \pm 1,13 ***	15,93 \pm 1,47 ***			
5	9,85 \pm 2,13	14,29 \pm 2,44 **	14,42 \pm 2,83 ***	16,45 \pm 4,16 **			
SUBUNIDADES (%)							
H	67,15 \pm 1,12	59,55 \pm 4,14 *	58,15 \pm 2,50 *	56,67 \pm 4,15 *			
M	32,85 \pm 1,12	40,45 \pm 4,14 ***	41,85 \pm 2,50 ***	43,32 \pm 4,15 ***			

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica. Entre paréntesis el número de animales por grupo. (*) Descenso significativo ($p < 0,001$). (**) Aumento significativo ($p < 0,01$). (***) Aumento significativo ($p < 0,001$). (****) Aumento significativo ($p < 0,05$).

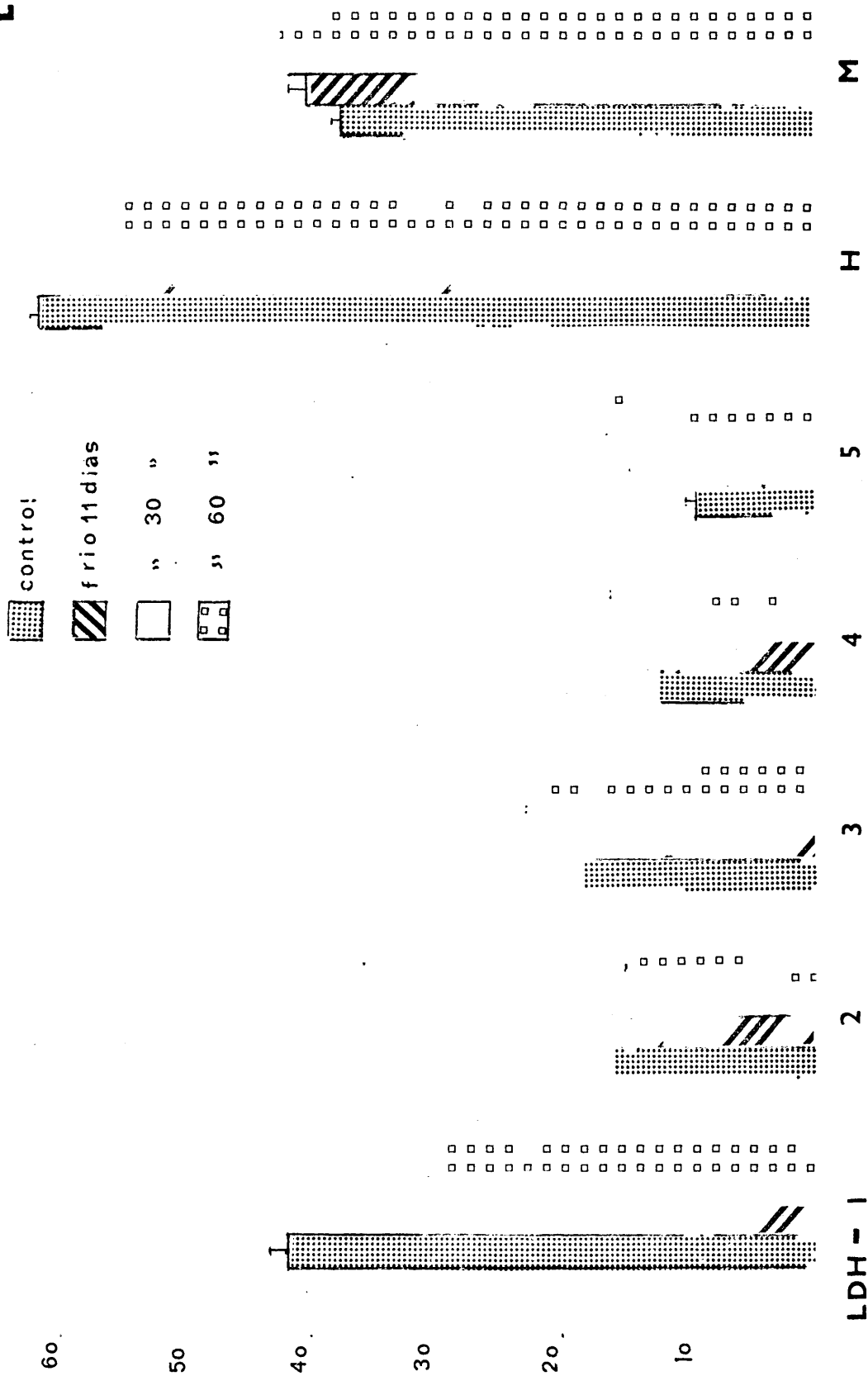
durante 60 días con el control, se ve un aumento significativo de las isoenzimas 3 ($0,05 > p > 0,02$), subiendo de 19,21 a 22,62%; 4 ($0,001 > p$), de 12,39 a 15,93%; y 5 ($0,01 > p > 0,001$), de 9,85 a 16,45%, además de las subunidades M ($0,001 > p$), de 32,85 a 43,32%. También hay un descenso de LDH_1 ($0,001 > p$), bajando de 42,14 a 30,50%, y de las subunidades H ($0,001 > p$), de 67,15 a 56,67%. La disminución de LDH_2 no resultó significativa. De la comparación con el grupo de frío de 11 días se deduce que hay un descenso significativo ($0,001 > p$) de la isoenzimas 2, bajando de 18,52 a 14,50%. La disminución de LDH_1 y de las subunidades H, así como el aumento de las isoenzimas 3, 4 y 5 y de las subunidades M, no resultaron ser cambios significativos con el mayor tiempo de adaptación al frío. Algo similar ocurre cuando se comparan los datos de actividad relativa del grupo de frío de 60 días con los del grupo de frío de 30 días, observándose una disminución significativa ($0,05 > p > 0,02$) de la LDH_2 , bajando de 16,38 a 14,50%, mientras que el descenso de las isoenzimas 1 y 4 y de las subunidades H, así como el aumento de las isoenzimas 3 y 5 y de las subunidades M, no resultaron ser cambios significativos producidos por el mayor tiempo de adaptación al frío.

En resumen, se observa un aumento significativo de las subunidades M común en los tres grupos experimentales (Fig. 15). Este aumento es, además, paralelo al tiempo de adaptación. Se observa también un aumento significativo de las isoenzimas 4 y 5 cuando se comparan los grupos experimentales con el control, sumándose a este aumento la isoenzima 3 en el caso de los grupos experimentales de 30 y 60 días. También se puede ver en esta comparación una disminución de la isoenzima 1 y, lógicamente, de las subunidades H.

Si se comparan los grupos experimentales entre sí, no hay diferencias significativas, excepto en la

%

LAR



-Fig. 15.- Representación de las actividades relativas (%) de las isoenzimas (1-5) y de las subunidades (H y M) de LDH de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas en el estado 33 del desarrollo (todo el animal). Experimento nº 1, puestas nºs 1 y 2 (LDH₅ rápida).

LDH₂, la cual va disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de adaptación a 8±2°C, después de un ascenso inicial (Fig. 15).

-b.-Experimento nº2.-

-i.-Actividad total.-

En la tabla XV se muestran los datos sobre la actividad total, expresada en nmoles de NADH oxidados por min por animal, obtenidos en este grupo de experimentos. Se ve que la actividad total del grupo de --- frío de 20 días es significativamente mayor (0,001>p) que la del grupo control, teniendo este último un valor medio de 937, mientras que el primero muestra una actividad media de 1473. El grupo de frío desde neúru la, con una actividad media de 4492, resulta significativamente mayor (0,001>p) que los otros dos grupos.

-ii.-Actividad específica.-

En cuanto a la actividad específica, expresada en nmoles de NADH oxidados por min por mg de proteína del sobrenadante, cuyos datos se encuentran también en la tabla XV, el grupo de frío desde neúru la -- mostró el valor medio más alto, 2016, siendo significativamente mayor (0,001>p, en ambos casos) que el -- control, 1020, y que el grupo de frío de 20 días, -- 1450. A su vez, el grupo de frío de 20 días, resultó ser significativamente mayor (0,001>p) que el control.

Así pues, hay un aumento de la actividad específica, al igual que en el caso de la actividad total, con la adaptación a 8±2°C, siendo mayor este aumento con la adaptación a largo plazo (frío desde neúru la).

-iii.-Actividades relativas de las isoenzimas y de -- las subunidades.-

1.-Heterogeneidad de la LDH₅.-

Según se ha dicho en el apartado IV.2.A, el -- grupo de animales del experimento nº2, correspondien-

TABLA XV

ACTIVIDADES TOTAL Y ESPECIFICA DE LDH (SUBUNIDAD M HIBRIDA) EN DISCOGLOSSUS PICTUS EN PREMETAMORFOSIS (ESTADO 33) ADAPTADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS.

	CONTROLES	CALOR	FRIO 20 DIAS	FRIO NEURULA
	(7)	(8)	(5)	(10)
ACTIV, TOTAL (nmoles NADH/ /min/animal	937 ± 170	1487 ± 148 *	1473 ± 200 *	4.492 ± 690 *

ACTIV. ESPEC.

(µmoles NADH/ /min/mg prot,)	1020 ± 200	1706 ± 172 *	1450 ± 160 *	2.016 ± 390 *
---------------------------------	------------	--------------	--------------	---------------

Los resultados se expresan como la media ± la desviación típica.

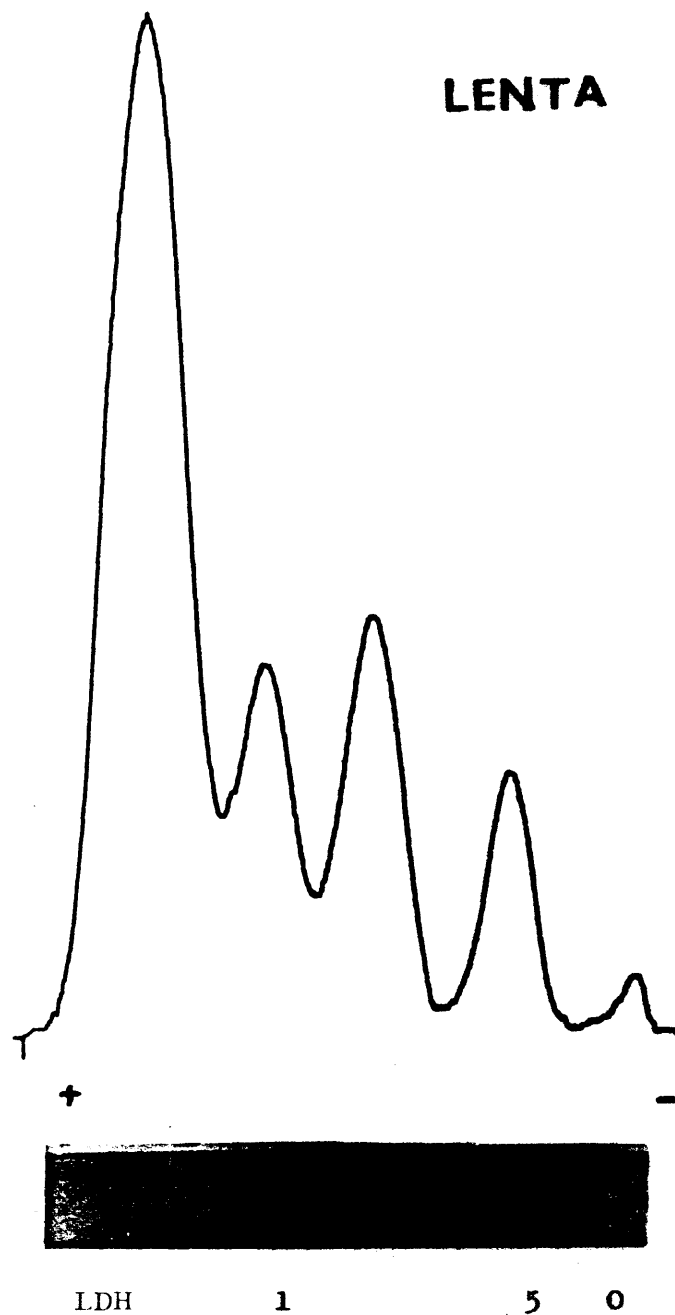
Entre paréntesis el número de animales en el grupo.

(*) Aumento significativo ($p < 0,001$)

te a la puesta n°3, resultó heterogéneo para el tipo de LDH₅, detectándose en el grupo adaptado a temperatura ambiente, control, 2 animales que poseían una -- LDH₅ "rápida", 10 con LDH₅ "intermedia" y 4 con LDH₅ "lenta". En el grupo de frío de 20 días se observaron 3 de velocidad electroforética rápida, 11 de veloci-- dad intermedia y 2 de velocidad lenta. En el grupo de frío desde néurula se apreciaron 3 animales con LDH₅ de tipo rápido, 9 de tipo intermedio y 4 de tipo lento. Se emplearon, en este experimento, solo los datos correspondientes a aquellos animales que mostraron una LDH₅ de tipo intermedio (también llamado subunidad M híbrida) a efectos de las actividades relativas. La figura 16 ilustra, de alguna manera, las diferencias en la velocidad electroforética descritas en lecturas del densitómetro de zimogramas correspondientes a mues-- tras de sobrenadantes de animales en el estado 33 del desarrollo. Es de notar que el pico de esta isoenzima, LDH₅, del grupo que mostró el tipo intermedio tiene -- una base más ancha que los correspondientes a los o-- tros dos, comenzando esta base, con respecto a la ve-- locidad electroforética, a la altura en que está uno de los dos tipos extremos y terminando a la altura -- del otro; en algunos casos, se han podido distinguir del orden de 5 sub-bandas en este tipo intermedio de LDH₅.

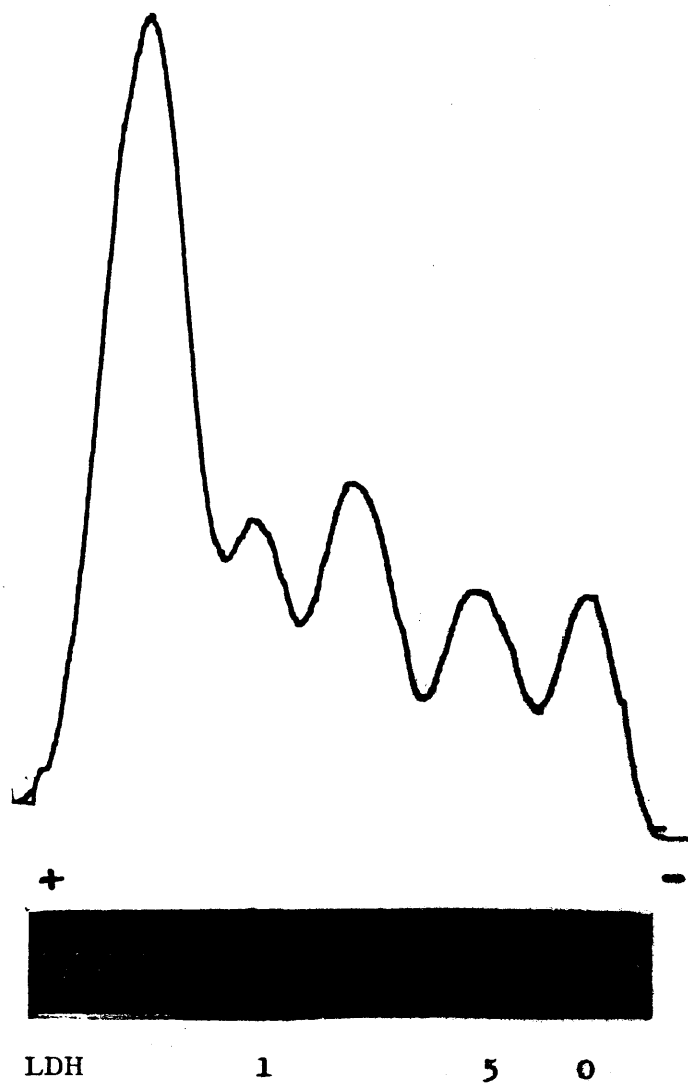
11.-Actividades relativas.-

Los datos obtenidos referentes a las activida-- des relativas de este grupo de experimentos se pueden ver en la tabla XVI. De la comparación entre el grupo control y el de frío de 20 días, se desprende la exis-- tencia de los siguientes cambios significativos: a) - aumento de LDH₃ (0,001>p), pasando de 15,82 en el gru-- po control a 21,77% en el de frío; LDH₄ (0,001>p), pa-- sando de 11,86 a 17,25%; y del porcentaje de subunida-- des M (0,001>p), siendo 35,08 en el control y 42,91% en el grupo de frío. b) Disminución de la isoenzima 1



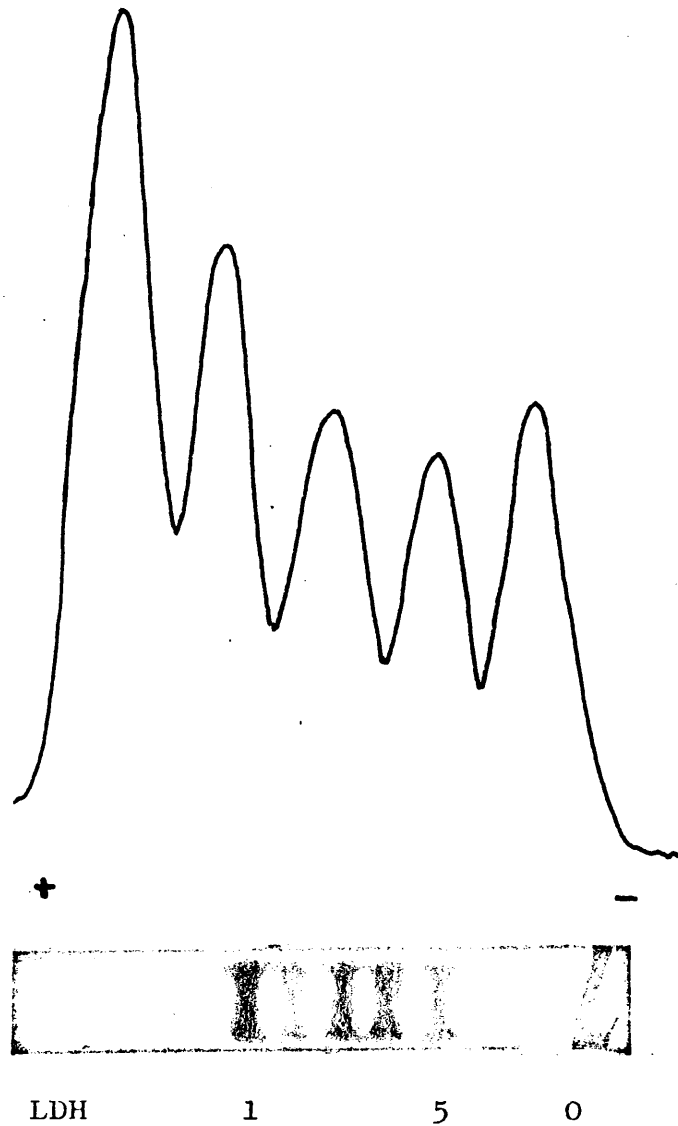
-Fig. 16a.- Electroferograma y curva densitomé-
trica de las isoenzimas de LDH de Discoglossus
pictus pictus variedad a manchas en el estado 33
del desarrollo. LDH₅ lenta. 0: origen.

INTERMEDIA



-Fig. 16b.- Electroferograma y curva densitométrica de las isoenzimas de LDH de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas en el estado 33 del desarrollo. LDH₅ intermedia. 0: origen.

RAPIDA



-Fig. 16c.- Electroferograma y curva densitométrica de las isoenzimas de LDH de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas en el estado 33 del desarrollo. LDH₅ rápida. 0: origen.

TABLA XVI

VARIACIONES EN LAS ISOENZIMAS DE LDH (%) EN LARVAS DE DIS-
COGLOSSUS PICTUS (ESTADO 33) SOMETIDAS A BAJA TEMPERATURA
(SUBUNIDAD M HIBRIDA).

ISOENZIMAS(%)	CONTROLES	FRIO (8) (20 dias)	FRIO(8) (desde neúricula)
LDH 1	44,11 ± 3,15	32,02 ± 3,14	26,85 ± 5,4
2	13,23 ± 3,92	13,12 ± 3,68	15,55 ± 2,67
3	15,82 ± 1,14	21,77 ± 1,96	18,71 ± 0,84
4	11,86 ± 0,50	17,25 ± 2,02	18,64 ± 1,95
5	14,98 ± 1,60	15,80 ± 3,63	20,24 ± 3,88
SUBUNIDADES (%)			
H	64,92 ± 1,24	57,09 ± 3,16	52,53 ± 4,94
M	35,08 ± 1,24	42,91 ± 3,16	47,47 ± 4,94

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo.

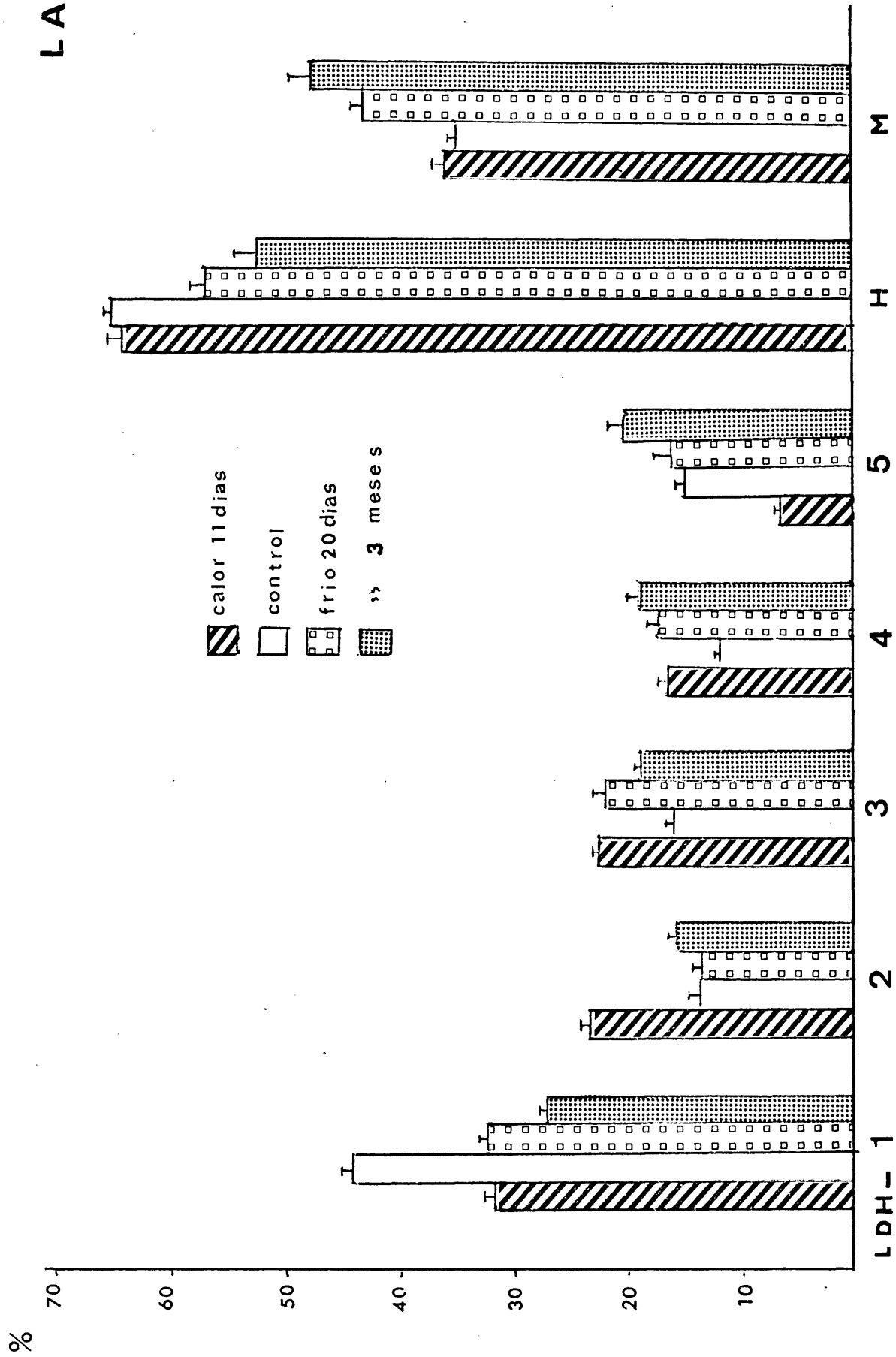
Todos los cambios son significativos en relación con los controles excepto para la LDH-2.

(0,001>p), bajando de 44,11 a 32,06%, y de las subunidades H (0,001>p), mostrando el control un 64,92% y el grupo de frío un 57,09%. Los restantes cambios, disminución de LDH₂ y aumento de LDH₅, no resultaron significativos.

Se apreciaron, además, en la comparación del grupo de frío desde néurula con el grupo control, las siguientes diferencias significativas: a) mayor porcentaje (0,001>p) de LDH₃, siendo del orden de 18,72; de LDH₄ (0,001>p), subiendo a 18,64; LDH₅ (0,001>p), que resultó ser de 20,24 frente a 14,98 del grupo control; y de las subunidades M (0,001>p), siendo en este grupo de frío del orden de 47,47%. b) Menor porcentaje de LDH₁ (0,001>p), con un 26,85; y de las subunidades H (0,001>p), bajando a 52,53. El aumento de LDH₂ no resultó significativo.

La comparación del grupo de frío desde néurula con el de frío de 20 días arrojó el siguiente balance: a) aumento significativo de LDH₅ (0,05>p>0,02), con un valor de 20,24%, frente al 15,80 que posee el grupo de frío de 20 días; aumento del porcentaje de las subunidades M (0,05>p>0,02), de 42,91 a 47,47%. b) Disminución significativa de: LDH₁ (0,05>p>0,02), de 32,06 a 26,85%; LDH₃ (0,01>p>0,001), de 21,77 a 18,72; y de las subunidades H (0,05>p>0,02), de 57,09 a -- 52,53%. Los aumentos de las isoenzimas 2 y 4 no resultaron significativos.

En resumen, la adaptación a 8±2°C produce un aumento significativo de las subunidades M (Fig. 17), aumento que es más acusado en lo que se podría llamar "adaptación a largo plazo". Esto lleva consigo el aumento en la actividad relativa de las isoenzimas más catódicas (LDH₅, LDH₄). Sin embargo, no se observa un aumento de LDH₂ con la adaptación a la baja temperatura a "corto plazo", que vaya desapareciendo a medida



-Fig. 17.- Representación de las actividades relativas (%) de las isoenzimas (1-5) y de las subunidades (H y M) de la LDH de Discoglossus pictus variedad a manchas en el estado 33 del desarrollo (todavía el animal). Experimento nº 2; puesta nº 3 (LDH₅ intermedia)

que progresa el tiempo de adaptación, como se pudo --
constatar en el grupo de experimentos del apartado an
terior (IV.2.A.a.iii.11).

-B.-Adaptación al calor.-

-a.-Actividad total.-

Los datos correspondientes a la actividad total del grupo de animales de la puesta nº3 adaptados durante 11 días, desde el estado de botón caudal hasta el 33 de desarrollo, a $29 \pm 2^\circ\text{C}$, se encuentran en la tabla XV, en la cual se dan también los resultados de las comparaciones con los distintos grupos del experimento nº2 de frío (IV.2.A.b.i), expuesto anteriormente. En la comparación con el grupo control del citado experimento, se encontró un aumento significativo ($0,001 > p$) de esta actividad, expresada en nmoles de -- NADH oxidados por min por animal, siendo de 937 en el grupo control y 1487 en el que nos ocupa. Si se compara este último con el grupo de frío de 20 días de a--quel experimento, se ve que hay un aumento no significativo con la adaptación al calor. Sin embargo, la adaptación al frío desde néurula, produce un aumento - en la actividad total, con un valor de 4492, significativamente mayor ($0,001 > p$) que el que produce la a--daptación al calor.

-b.-Actividad específica.-

En cuanto a la actividad específica, expresada en nmoles de NADH oxidados por min por mg de proteina del sobrenadante, la tabla XV muestra también -- que el grupo adaptado a $29 \pm 2^\circ\text{C}$, con un valor medio de esta actividad de 1706, posee cifras significativamente mayores ($0,001 > p$) que las del grupo control del experimento nº2 de frío citado (IV.2.A.b.ii), con un valor medio de 1020, y que las del grupo de frío de 20 días ($0,02 > p > 0,01$) de aquel experimento, con 1450. -- Sin embargo, resultaron significativamente menores --

(0,001>p) que las exhibidas por el grupo de frío desde néurula, con unos valores medios de 2016, también de aquel experimento.

-c.-Actividades relativas de las subunidades y de las isoenzimas.-

-i.-Heterogeneidad de la LDH₅.-

Puesto que los animales de este experimento proceden, al igual que los del experimento nº2 de frío, de la puesta nº3, resultaron heterogéneos en el tipo de LDH₅. Se observaron 4 animales del tipo rápido, 10 del tipo intermedio y 2 del tipo lento, utilizándose, a efectos de las medidas de actividad relativa, solo los datos correspondientes al tipo intermedio, por ser el grupo mayoritario y porque sus controles son los del experimento nº2 de frío.

-ii.-Actividades relativas.-

En la tabla XVII se detallan los resultados obtenidos en este experimento con respecto a las actividades relativas de las isoenzimas y a las subunidades de la LDH. También se muestran las comparaciones con el grupo utilizado como control en el experimento nº2 de frío (IV.2.A.b.iii.11), descrito anteriormente. Esta comparación es posible porque, como se describió en material y métodos, pertenecen a la misma puesta. Así, se observa que, con respecto al grupo control, hay un aumento significativo (0,001>p) de las isoenzimas 2, 3 y 4, poseyendo la LDH₂ una actividad relativa de 23,35% en la adaptación al calor, frente al 13,23% del grupo control; LDH₃, 22,32 frente a 15,82%; y LDH₄, 16,46 frente a 11,86%. Por otro lado, se aprecia una disminución significativa (0,001>p) de las isoenzimas 1 y 5; si el grupo de 29±2°C posee 31,54% de media de LDH₁, el grupo control tiene un 44,11%, y, en cuanto a LDH₅, 6,33 y 14,98% respectivamente. Las diferencias entre los porcentajes de las subunidades H y M, disminución del de las primeras

TABLA XVII

VARIACIONES EN LAS ISOENZIMAS DE LDH (%) EN LARVAS DE DISCO
GLOSSUS PICTUS (ESTADO 33) SOMETIDAS A TEMPERATURA ELEVADA
 (29 °C ± 2) (SUBUNIDAD M HIBRIDA)

ISOENZIMAS (%)	CONTROLES (8)	CALOR (11 dias) (8)
LDH- 1	44,11 ± 3,15	31,54 ± 2,90
2	13,23 ± 3,92	23,35 ± 1,92
3	15,82 ± 1,14	22,32 ± 1,85
4	11,86 ± 0,50	16,46 ± 2,76
5	14,98 ± 1,60	6,33 ± 1,77
SUBUNIDADES (%)		
H	64,92 ± 1,24	64,33 ± 3,22
M	35,08 ± 1,24	35,67 ± 3,22

Los resultados se expresan como la media ± la desviación típica.

Entre paréntesis el número de animales por grupo

Todos los cambios de las isoenzimas son significativos
 (p < 0,001).

y aumento de las segundas, no resultaron significativas.

Si se comparan los resultados del grupo de -- frío de 20 días del experimento nº2 de frío con los - del grupo de calor, se observa un aumento significativo con la adaptación a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ de LDH_2 ($0,001 > p$), pasando de 13,12 del grupo de frío a 23,35%; y del porcentaje de subunidades H ($0,001 > p$), de 57,09 a 64,33. Se observa también una disminución significativa --- ($0,001 > p$) de LDH_5 , siendo 6,33% en la adaptación al - calor y 15,80 en el grupo de frío; y de las subunidades M ($0,001 > p$), bajando de 42,91 en el grupo de frío a 35,67 en el adaptado a calor. La disminución de -- LDH_1 y LDH_4 y el aumento de LDH_3 no resultaron significativos.

En la comparación con el grupo de frío desde néurula del experimento nº2, se puede observar un aumento significativo de LDH_1 ($0,05 > p > 0,02$), pasando de 26,85 a 31,54%; LDH_2 ($0,001 > p$), teniendo 15,55 el grupo de frío y 23,35% el que nos ocupa; LDH_3 ($0,001 > p$), de 18,72 a 22,32%, y de las subunidades H ($0,001 > p$), de 52,53 a 64,33%. También se puede observar una disminución significativa de LDH_5 ($0,001 > p$), bajando de 20,24 a 6,33%, y de las subunidades M ($0,001 > p$), de - 47,47 a 35,67%. La disminución de LDH_4 no resultó significativa.

De manera que, si bien la comparación con el grupo control no arroja una evolución opuesta del modelo de isoenzimas a la de la adaptación a $8 \pm 2^\circ\text{C}$, la adaptación a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ origina un modelo en cierto modo opuesto al producido por la baja temperatura, sobre todo cuando esta última adaptación lo es a largo plazo. (Fig. 17).

-V.-RESUMEN GENERAL DE LOS RESULTADOS.-

-1.-Adaptación al frío.-

-A.-Frecuencia cardiaca.-

Se observa que la adaptación a $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperíodo reducido produce un descenso significativo de la frecuencia cardiaca, tanto en hembras adultas como en larvas al estado 33.

-B.-Consumo de oxígeno.-

Se ha apreciado un descenso en el consumo de oxígeno de las larvas en el estado 33 del desarrollo paralelo al de la temperatura de medida, tanto en los animales activos como en los anestesiados. Por lo tanto, el metabolismo, la tasa metabólica y el consumo de oxígeno por mg de peso húmedo, tanto en condiciones de actividad como en condiciones estandar (anestesiados), muestran un descenso paralelo al de la temperatura. La adaptación a $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ hace que este descenso sea aún más pronunciado, excepto en el caso del consumo de oxígeno de los animales adaptados a frío anestesiados y medidos a 10°C , el cual es mayor que el del adaptado a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ activo, y en el caso del metabolismo estandar, mayor que el de los animales adaptados a esta última temperatura; esto se podría deber posiblemente a un efecto secundario del anestésico.

Estos resultados implican también que el consumo de oxígeno en el estado 33 del desarrollo de D. pictus pictus presenta un fenómeno de aclimatación o compensación inversa según el modelo descrito por Precht (1958), puesto que el consumo de oxígeno de los animales adaptados al frío medido a 10°C es menor que el de los animales adaptados a temperatura ambiente - medido también a 10°C .

-C.-Dimensiones corporales.-

La adaptación a las condiciones experimentales produce, en el animal adulto, una pérdida no significativa de peso. Mientras que, en el estado 33, la

adaptación a largo plazo, produce un aumento significativo de la longitud del cuerpo, aunque, a corto plazo (20 días), haya un aumento no significativo del tamaño de la región céfalo-truncal y una disminución significativa de la región caudal.

-D.-Actividades de la LDH.-

-a.-Actividad total.-

Se observó un aumento general de esta actividad, significativo en todas las larvas en el estado 33 adaptadas al frío.

-b.-Actividad específica por mg de tejido fresco.-

Se ha apreciado también un aumento general de esta actividad en los tejidos de hembra adulta examinados, excepto en el corazón de las de invierno, con la adaptación al frío. Este aumento es significativo solo en el caso del cerebro del animal adaptado a condiciones experimentales de frío y en el hígado y cerebro de los animales de invierno.

-c.-Actividad específica por mg de proteína.-

Aquí se observó un comportamiento diferente entre los tejidos de los animales adultos y las larvas en el estado 33. Mientras que en los primeros la adaptación a baja temperatura produjo un ligero descenso de actividad, significativo solo en el caso del corazón de hembras adaptadas experimentalmente, en las larvas indujo un aumento que fué significativo en todos los casos.

-d.-Actividades relativas de las isoenzimas y de las subunidades.-

-i.-Isoenzimas.-

-LDH₁: En todos los casos, se observó un descenso de esta isoenzima. Este descenso fué significativo en el

caso del hígado y del corazón del adulto adaptado a $8 \pm 2^\circ\text{C}$, y en el hígado y el cerebro del adulto de invierno. En las larvas en el estado 33, en todos los casos resultó significativo.

-LDH₂: Se observó un descenso en el porcentaje de esta isoenzima en todos los casos, excepto en el cerebro del adulto adaptado experimentalmente al frío, y en las larvas expuestas a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 11 días y las expuestas a esta temperatura desde el estado de néurula. Este descenso era significativo en el hígado y corazón de adultos adaptados experimentalmente a baja temperatura.

-LDH₃: Se apreció aquí un aumento en todos los experimentos, excepto en los del hígado de animales adultos adaptados experimentalmente al frío. Este aumento resultó significativo en el cerebro de este último grupo de animales y en el corazón del adulto de invierno. En la larva en el estado 33 fué significativo en todos los casos, excepto en la adaptación a corto plazo (11 días) a baja temperatura.

-LDH₄: Con respecto a esta isoenzima, la adaptación al frío produjo un aumento en todos los casos, excepto en los del hígado y el cerebro de los adultos adaptados experimentalmente y en el hígado del adulto de invierno. Este aumento resultó significativo en el caso del corazón del adulto adaptado experimentalmente y en todos los experimentos sobre larvas al estado 33.

-LDH₅: También se observó un aumento de esta isoenzima en todos los casos, excepto en el cerebro del adulto adaptado experimentalmente y en el corazón del adulto de invierno. Este aumento fué significativo en el caso del corazón del adulto adaptado experimentalmente y en el cerebro del adulto de invierno, y en --

las larvas en el estado 33, en todos los casos, excepto en los adaptados al frío durante 20 días.

-ii.-Subunidades.-

-M.-Hay un aumento en el porcentaje de subunidades M inducido por el frío. Este aumento resultó significativo en el caso del hígado y el corazón del adulto adaptado experimentalmente a $8 \pm 2^\circ\text{C}$, ayuno y oscuridad y en el cerebro del adulto de invierno. En el estado 33, el aumento fué significativo en todos los casos. El cerebro del adulto adaptado experimentalmente mostró un descenso no significativo en el porcentaje de estas subunidades.

-H.-Lógicamente, en este caso, el efecto del frío resultó ser justamente el inverso del descrito en las subunidades M.

Entonces, según los datos recogidos, la adaptación al frío, tanto experimental como natural, parece ejercer una influencia sobre Discoglossus pictus pictus, tanto en el animal adulto como en la larva en el estado 33, con ciertas semejanzas entre estos dos casos. Esta influencia se traduce en los efectos descrito en las líneas de más arriba.

-2.Adaptación al calor.-

En este caso, se van a resumir los resultados del grupo de animales en el estado 33 adaptados a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ en comparación con los tres grupos del experimento nº2 de frío.

-A.-Dimensiones corporales.-

Hay un aumento no significativo del tamaño -- frente al grupo control, adaptado a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$); un aumento no significativo de la región céfalo-truncal y significativo de la región caudal --

frente al grupo de frío de 20 días, y un descenso significativo del tamaño total frente al grupo de frío - desde néurula.

-B.-Actividades de la LDH.-

-a.-Actividad total.-

Se produce una elevación significativa de esta actividad con respecto a la del grupo control; un aumento no significativo frente al grupo de frío de 20 días y un descenso significativo frente al grupo de frío desde néurula. De modo que la adaptación al calor produce un efecto semejante al producido por la adaptación al frío durante 20 días, pero inferior, en cuanto a crecimiento, que el de la adaptación al frío a largo plazo.

-b.-Actividad específica.-

En cuanto a la actividad específica con respecto al contenido de proteínas, se ha encontrado un aumento significativo con respecto al grupo control y al grupo de frío de 20 días, y un descenso significativo frente al grupo de frío desde néurula. De modo que la adaptación al calor produce sobre esta actividad - un efecto superior a la adaptación al frío durante 20 días, pero inferior a la adaptación a $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a largo plazo, en cuanto a aumento de esta actividad.

-c.-Actividades relativas de las isoenzimas y de las subunidades.-

-i.-Isoenzimas.-

-LDH₁: Se ha observado una disminución en el porcentaje de esta isoenzima con respecto al grupo control, - significativa, y los animales adaptados al frío durante 20 días, no significativa. Frente al grupo adaptado a frío desde néurula, se observa un aumento significativo.

-LDH₂: Se observó un aumento significativo de esta i-

soenzima frente a los otros tres grupos: control, --
frío desde 20 días y frío desde néurula.

-LDH₃: La adaptación al calor produce un aumento en -
esta isoenzima frente al grupo control y los dos de -
frío considerados. Este aumento resultó significativo
en el primer caso y en el de frío desde néurula.

-LDH₄: Esta isoenzima resultó significativamente supe
rior en el grupo adaptado al calor frente al control.
Sin embargo, era menor, pero no significativamente, -
frente a los otros dos grupos.

-LDH₅: En este caso, la isoenzima 5 del grupo adapta
do a 29±2°C resultó significativamente inferior a la
de los otros tres grupos.

-ii.-Subunidades.-

-M.-En comparación con las larvas adaptadas a tempera
tura ambiente, se produce un aumento no significativo
de estas subunidades con la adaptación al calor. En --
comparación con los dos grupos de datos de los anima
les adaptados al frío, se observó siempre un descenso
significativo en el porcentaje de subunidades M.

-H.-Se observó justo lo contrario de lo que se ha des
crito para las subunidades M.

-3.-Heterogeneidad de la LDH₅.-

Se ha observado una heterogeneidad en la LDH₅
en todos los grupos de experimentos sobre las activi
dades relativas de las isoenzimas de LDH, la cual es
independiente del tipo de adaptación. Esta heteroge--
neidad consiste en la presencia de tres tipos de LDH₅
según la velocidad electroforética: "rápida", con un
pico en el densitograma de base estrecha; "intermedia",
con un pico de base ancha y la distinción, en algunos
casos, de 5 sub-bandas; y "lenta", con un pico de base

estrecha; los extremos del pico intermedio coinciden, en cuanto a distancia desde el origen, con los picos rápido y lento. En el supuesto de que las isoenzimas de LDH de D. pictus pictus variedad a manchas, como - en la mayoría de los vertebrados, sean tetrámeros compuestos por solo dos tipos de subunidades, estas diferencias en la velocidad electroforética de la LDH₅ podrían estar originadas por la existencia de varios tipos de subunidades M, dependientes de alelos del locus M, de forma que se podría hablar de subunidad M rápida, constituyente de la LDH₅ rápida, subunidad M híbrida, constituyente del tipo intermedio, y subunidad M lenta, constituyente del tipo lento. Esto se puede apoyar también en que la heterogeneidad de la LDH₅ se refleja, además, en las restantes isoenzimas que contienen en su estructura tetramérica subunidades M, de forma que, por ejemplo, cuando la LDH₅ es lenta, - las isoenzimas 4, 3 y 2 muestran también menor velocidad electroforética (Fig. 16); si la velocidad es intermedia, los picos de estas otras tres isoenzimas -- exhiben a su vez una base más ancha que en el caso de los modelos de los animales que poseen cualquier otro de los dos tipos de LDH₅.

Se ha podido observar que, al menos en la zona donde han sido capturados los animales adultos, el tipo de LDH₅ rápido parece ser el más frecuente. En la puesta nº3, donde las proporciones de animales con -- LDH₅ rápida-intermedia-lenta parecen aproximarse al - modelo 1-2-1, no se pudo determinar el fenotipo LDH₅ - de los padres, por lo que la información genética al respecto no está completa.

-4.-Km de las isoenzimas de LDH para el lactato.-

La adaptación a baja temperatura en el adulto produjo un ligero aumento en la Km para lactato de - LDH₁ y una disminución de dicha constante en las isoen

zimas restantes. Estos cambios no resultaron significativos y, por lo tanto, no fueron considerados como indicativos de ninguna causa. Los valores de esta K_m - son mínimos en la LDH_1 , del orden de $4mM$, y máximos - en la LDH_5 , del orden de $14mM$, siendo los valores intermedios crecientes de la LDH_2 a la LDH_4 , indicando que las isoenzimas anódicas tienen aparentemente más afinidad por el lactato que las catódicas (Fig. 14).

DISCUSSION

Es sabido que la temperatura altera la frecuencia cardiaca, de manera que en los poiquiloter--mos, un ambiente frío provoca bradicardia. Esta bradi--cardia parece estar originada, en los anfibios anu--ros, por un aumento del tiempo de repolarización (Bra--dy, 1964). Además, la fase activa de la contracción muscular del ventrículo cardiaco de anfibios anuros, está ajustada de tal manera que ocupa solo la mitad del ciclo, independientemente de la frecuencia del latido, lo cual, aseguraría un período de recuperación que, indudablemente, es necesario para la supervivencia; dicho de otra forma, el pico máximo de contracción --ventricular responde al final de la fase 3 de la re--polarización, que señala el final del proceso, inde--pendientemente de la duración de la repolarización. Estas observaciones se han obtenido a partir de ani--males adultos de especies del género Rana.

Por otro lado, otros autores han apuntado un descenso en la frecuencia cardiaca con la adaptación al frío, si bien apuntan un aumento en los dos prime--ros días de adaptación a la nueva temperatura en Ra--na temporaria (Harri, 1974b). También se han descrito ajustes compensadores en la frecuencia cardiaca de o--tras especies del género Rana, en función de la ten--sión de oxígeno, frente a la aclimatación térmica, --aunque son experimentos realizados en animales sumor--gidos (Jones, 1972).

Por tanto, la disminución en la frecuencia car--diaca observada en nuestros experimentos, tanto en ani--males adultos como en larvas al estado 33, a conse--cuencia de la adaptación al frío, podría deberse a un efecto directo de la temperatura sobre la función cardiaca.

Además, considerando la solubilidad del oxí--

geno en el agua, los poiquilothermos acuáticos se enfrentan con una demanda de oxígeno igual o menor a baja temperatura, en un medio donde la tensión de este gas es más elevada que a alta temperatura, con lo que la disminución de la frecuencia cardiaca está -- combinada probablemente con ajustes en la eficacia -- de la extracción y la tasa de ventilación para asegurar un aporte de oxígeno adecuado en cada situación (Hazel y Prosser, 1974). D. pictus pictus adulto es un anfibio semiterrestre, por lo que este problema -- resultaría de menor importancia; no obstante, si con el frío el animal entra en torpor, los requerimientos de oxígeno podrían disminuir paralelamente a las necesidades energéticas, con lo que descendería la -- frecuencia cardiaca. Estos puntos no han sido comprobados en nuestro laboratorio, por lo que permanecen como meras especulaciones. Sin embargo, las larvas -- de D. pictus pictus funcionan como poiquilothermos acuáticos, con lo que el descenso de la frecuencia -- cardiaca, que se mantiene en niveles semejantes aunque la adaptación al frío sea a largo plazo, estaría de acuerdo con un aumento, no comprobado en nuestras condiciones, de la tensión de oxígeno del medio, así como con un descenso en los requerimientos de oxígeno, medidos a través del consumo de oxígeno de todo el animal. Por otro lado, se ha podido apreciar, si bien -- no se dispone de datos suficientes al respecto, un aumento en la frecuencia cardiaca de las larvas en estado 33 adaptadas a $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se han descrito multitud de casos de compensación parcial o perfecta, según el modelo de Precht, en el consumo de oxígeno en muchos poiquilothermos acuáticos, incluidos los peces (Prosser, 1973, Hazel y Prosser, 1974). Por otro lado, se han observado -- también casos de compensación inversa en el consumo de oxígeno frente a la temperatura en diversos anfibios adultos, lo cual se ha relacionado con la exis-

tencia de torpor inducido por el frío (Packard, 1972; Fitzpatrick et al. 1971, 1972; Dunlap, 1971, 1972; - Holzman y McManus, 1973), puesto que este modelo de compensación podría producir un mantenimiento de las reservas metabólicas durante los periodos de torpor. En nuestras observaciones se ha podido constatar que D. pictus pictus en el estado 33 del desarrollo muestra compensación inversa en el consumo de oxígeno de todo el animal adaptado a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y a $8 \pm 2^\circ\text{C}$. La Q_{10} elevada (próxima a 2) del consumo de oxígeno de las larvas adaptadas a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ entre 10 y 20°C , podría ser indicativo de una compensación del metabolismo frente a temperaturas superiores a las de adaptación peor - que la que muestran las larvas adaptadas a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ -- (Hazel y Prosser, 1974); y la disminución de la Q_{10} de las larvas adaptadas al frío al medir el metabolismo a 20 y 25°C podría estar relacionado con un -- descenso de la temperatura letal superior de estos animales a consecuencia de la adaptación (Prosser, - 1973). Sin embargo, en el caso de las larvas en el estado 33, no se puede hablar de torpor en el sentido de letargo absoluto con el frío, puesto que muestran actividad espontánea (incluida la alimentación) durante la adaptación al frío, aunque algo disminuida frente a las larvas adaptadas a temperatura ambiente, según se ha podido observar.

La disminución de la frecuencia cardiaca es uno de los factores que entran en juego en el fenómeno del sueño invernal (hibernación) de los anfibios. Sin embargo, otros de los criterios es la inactividad (Brattstrom, 1970) y el aumento de peso (Holzapfel, 1937). En el caso de D. pictus pictus adulto, - no se ha observado variación significativa en el peso del animal entero durante la adaptación experimental al frío, ayuno y fotoperíodo reducido (condiciones que podrían provocar hibernación), ni inactividad total en los animales de invierno, lo cual podría

confirmar que este animal no hiberna, pero sí presen
ta torpor.

La aclimatación al frío puede alterar el equi-
librio iónico y, en algunos casos, el hídrico de los
poiquilotermos acuáticos (Hazel y Prosser, 1974). Se
han descrito algunos casos en los que no varían los
iones Na^+ , Cl^- y K^+ ni en el plasma ni en los teji-
dos de algunos peces dulceacuícolas aclimatados al -
frío, pero sí aumenta el contenido de agua en los te-
jidos (Houston et al. 1968). Se ha sugerido, además,
que, puesto que otras observaciones sobre los cambios
en las concentraciones de los iones de los peces ma-
rinos y dulceacuícolas y de la misma especie de pez
adaptada a los dos tipos de ambientes se producen en
tal dirección de manera que se reduce el gradiente -
osmótico en un ambiente de frío, podría existir una
adaptación fisiológica para conservar energía en -
frío, originada por una limitación en el gasto de e-
nergía en lugar de un impedimento de la osmorregula-
ción per se (Prosser et al. 1970). Aunque la regula-
ción iónica se altere en temperaturas bajas extremas,
parece que se puede mantener la osmorregulación, por
lo menos en peces dulceacuícolas (Umminger, 1971), me
diante determinadas sustancias, identificada en al-
gunos casos como glucosa (Umminger, 1969, 1971b). En
nuestros experimentos, se ha podido detectar en D. -
pictus pictus en el estado 33 adaptado al frío a lar-
go plazo un aumento de tamaño; se pensó que este au-
mento podría estar relacionado con un aumento en el -
contenido hídrico del animal, al comportarse en este
estado, en cierto modo, como un teleósteo dulceacuí-
cola. Sin embargo, posteriormente se pudo apreciar -
que, aunque parece haber un ligero aumento en el con
tenido de agua de estos animales con la adaptación -
al frío, el aumento del peso seco es más substancial.
Se ha podido observar que los animales, durante el -
período de adaptación, no avanzan en el desarrollo,

cuando esta se realiza a partir de animales en el estado 33, de manera que puede permanecer en el mismo estado, al menos morfológicamente, durante 2 meses. D. nictus pictus desde el estado de botón caudal y, sobre todo, a partir del estado 30, inicio de la premetamorfosis y período en el que comienza a alimentarse, hasta el estado 45, inicio de la metamorfosis y fin de la alimentación herbívora, sufre un crecimiento paralelo a la evolución de la organogénesis; sería probable que la adaptación al frío provocase un retraso mayor en la organogénesis que en el crecimiento. Sin embargo, la adaptación al frío durante 20 días de animales en el estado 33, parece inducir un descenso en el tamaño de la cola, con lo que serían necesarios estudios más detallados para comprobar esta hipótesis. Por otro lado, el desarrollo se acelera durante la adaptación al calor, según se ha podido observar en nuestros experimentos al respecto, pero no se han podido apreciar variaciones en el tamaño de los animales adaptados a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ frente a los adaptados a temperatura ambiente (controles). Así pues, en este caso, parece que no se altera la relación entre crecimiento y organogénesis.

Se ha observado que la mayoría de las enzimas glucolíticas de los poiquiloterms se caracterizan por cambios en la actividad específica, definidos por la razón de esta actividad en los animales aclimatados al frío a la de los animales aclimatados al calor (Frío/Calor) medidas ambas a una temperatura intermedia a las de aclimatación, tales que la razón frío/calor oscila entre 1 y 2. Se ha podido demostrar esta característica en lactato deshidrogenasa de diversos peces (Lehmann, 1970; Künnemann et al. 1970; Lehmann, 1970b), hablándose entonces de que esta enzima, en estos casos, muestra compensación parcial, ajustándose a los tipos descritos por Precht (1958) (Hazel y Prosser, 1974). Se han descrito efectos si-

milares en toda una serie de enzimas relacionadas, - en principio, con la producción de energía, si bien, las enzimas integradas en el ciclo de las pentosas - mostraban una razón frío/calor de la actividad específica por encima de 2 (Hazel y Prosser, 1974).

Sin embargo, se han descrito casos de enzimas, también relacionadas con la producción de energía, que no muestran este efecto. Sirvan como ejemplo la enzima málica, con una razón frío/calor de 0,6, y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, con una razón frío/calor de 0,65 de músculo y tejido adiposo de Rana esculenta en ayunas (Baranska y Wlodawer, 1969), mostrando, por lo tanto, una compensación tipo 5 (inversa) de Precht. Esto se ha relacionado con la existencia de fenómenos de torpor o de letargo, siendo consistentes estas observaciones con las del consumo de oxígeno de animales enteros que experimentan letargo inducido por el frío (Packard, 1972; Fitzpatrick et al. 1971, 1972; Dunlap, 1971, 1972; Holzman y McManus, 1973) y con la economía de reservas metabólicas durante los períodos de letargo.

Por otro lado, se ha puesto en tela de juicio la inclusión de las enzimas glucolíticas en la categoría de enzimas compensadoras, por la observación de que, en algunas especies de peces, ciertas enzimas glucolíticas, incluida la lactato deshidrogenasa, muestran adaptación inversa. Así, en la LDH de músculo de cⁱprino se han descrito adaptación tipo 2 de Precht en la aclimatación a 5 y 15°C (Lehmann, 1970) y tipo 5 (inversa) en la aclimatación a 5 y 25°C (Wilson, 1973). Posteriormente, no se han observado cambios en la actividad específica LDH de músculo de cⁱprino al aclimatar al pez a 5, 15 y 25°C, realizándose las medidas a estas tres temperaturas, si bien la media de los animales de 5°C resultó menor que la de los de 25°C (Wilson et al. 1975). La LDH de múscu

lo del pez Lepomis cyanellus mostró también compensación inversa (Wilson, 1973). Sin embargo, se ha observado también un descenso significativo en la LDH del cerebro de este mismo pez, mientras que el músculo, hígado, corazón y ojo de este animal no muestran variaciones significativas con la aclimatación a 5 y 25°C, al medirse esta actividad a 15°C (Shaklee et al. 1977); no obstante, el músculo exhibe un descenso significativo de otras enzimas glucolíticas (aldolasa y piruvato kinasa) y un aumento significativo de las enzimas relacionadas con la oxidación (succínico deshidrogenasa, citocromo oxidasa), mientras que el cerebro muestra un aumento significativo de las mismas enzimas glucolíticas que el músculo, al igual que de las oxidativas. Esto podría ser un índice de las diferentes reorganizaciones metabólicas que tendrían lugar en los diferentes tejidos (el cerebro utiliza prácticamente solo glucosa para la producción de energía), por lo que no sería muy adecuado hablar de que una determinada enzima en una determinada especie compensa la acción de la temperatura durante la aclimatación, puesto que las respuestas pueden ser específicas de tejido (Shaklee et al. 1977). Basándose en observaciones de este tipo, se ha sugerido que la capacidad glucolítica no tendría por qué aumentar en el frío, cuando el ambiente, en el caso de los poiquiloterms acuáticos sobre todo, es relativamente aerobio (Somero, 1973; Wilson, 1973), si bien parece que las variaciones de la tensión de oxígeno, entre límites naturales, en el agua no afectan a las actividades enzimáticas en algunos peces (Shaklee et al. 1977). Además, se ha comprobado, mediante el empleo de inhibidores metabólicos, la utilización predominante de la vía glucolítica para el metabolismo de hidratos de carbono en la aclimatación a altas temperaturas, usándose rutas alternativas -- del metabolismo de hidratos de carbono (ciclo de las pentosas) en la aclimatación al frío (Hazel y Prosser,

1974). Estos resultados no están apoyados plenamente por las evidencias disponibles de las medidas directas de la actividad catalítica de las enzimas glucolíticas.

En nuestros experimentos con animales adultos, se ha encontrado una tendencia de aumento en la actividad específica por mg de tejido, que solo resultó significativa en el caso del cerebro de los animales adaptados al frío experimentalmente y en el hígado y cerebro de los animales de invierno. Sin embargo, la actividad específica por mg de proteína muestra en todos los casos una tendencia al descenso con la adaptación al frío, resultando solo significativa en el caso del corazón de la adaptación experimental. Esta diferencia en la respuesta podría estar originada por un aumento en el contenido de proteínas de los sobrenadantes (punto que se ha podido observar que es cierto) que reflejase un aumento en el contenido de proteínas del tejido (punto que no se ha comprobado), si bien en algunos trabajos se han descrito aumentos en la síntesis general de proteínas en animales aclimatados al frío (Hazel y Prosser, 1974). No obstante, dada la variabilidad de los datos de la actividad específica por mg de tejido, parece más correcto referirse a los datos de actividad específica por mg de proteína. En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio sobre adaptación experimental de D. pictus pictus, se pudo comprobar una tendencia semejante en la disminución de la actividad específica por mg de proteína en los mismos tejidos examinados.

La disminución significativa en el corazón de la actividad específica por mg de proteína parece guardar una cierta relación con la disminución de la frecuencia cardiaca con la adaptación al frío. Las diferencias entre los animales adaptados experimen--

talmente y los de invierno (la actividad específica de la LDH en el corazón de estos últimos no disminuye significativamente) podría deberse a la influencia de la dieta (los animales experimentales permanecen en ayunas) y a que las condiciones en el hábitat natural no son fijas. Conviene también recordar que el animal adulto durante el invierno parece que sufre un estado de torpor, disminuyendo su actividad y su frecuencia de alimentación, con lo que la adaptación experimental sería una "exageración" de lo que ocurre en condiciones naturales.

En el estado 33 del desarrollo, D. pictus - pictus es un poiquiloterma acuático, siendo la respiración branquial y cutánea. Esto quiere decir que dependerá de la temperatura del medio ambiente acuático y de la tensión de oxígeno en el agua, de forma semejante a lo que ocurre en peces. Las observaciones realizadas en este estado del desarrollo con respecto a las actividades específica y total muestran un aumento de ambas con la adaptación a la baja temperatura, estadísticamente significativo en todos los casos, y que este aumento es más pronunciado si la adaptación se realiza desde los primeros estados del desarrollo. Con la adaptación a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ de larvas desde el estado de botón caudal hasta el 33, se ha observado en nuestros experimentos un aumento significativo de las actividades total y específica de orden similar al de la adaptación al frío en el estado 33 durante 20 días pero inferior al producido por la adaptación a la baja temperatura desde el estado de néurula.

Aunque las medidas de las actividades total y específica en nuestros experimentos se realizaron a 30°C en todos los casos, es inevitable la comparación con los resultados de otros autores. Así, los resultados de nuestras experiencias sobre las activii

dades específicas en los tejidos de los animales adultos muestran una reacción cualitativa semejante - en todos los tejidos con la adaptación al frío, que con respecto a la actividad específica por mg de proteína se puede resumir en una tendencia a disminuir. Esto es comparable a la falta de aclimatación e incluso a la aclimatación inversa descrita por otros - autores. Estaría también en consonancia, en cierto modo, con la explicación ofrecida en algunos casos - de que este tipo de compensación de actividad enzimática guarda una relación con los estados de letargo o torpor, estados caracterizados por presentar los animales inactividad, disminución de la frecuencia cardíaca, falta de compensación en el consumo de oxígeno y aumento de peso, en el caso de los anfibios. Ya se ha dicho que D. pictus pictus disminuye la actividad espontánea y la frecuencia cardíaca, pero no aumenta el peso con la adaptación al frío en los animales adultos, aunque no se tienen datos sobre el consumo de oxígeno de todo el animal. Así pues, los resultados de la actividad específica por mg de proteína podrían guardar cierta relación con el cierto grado de torpor o, al menos, entumecimiento que presentan los animales adultos adaptados al frío.

En el estado 33 del desarrollo, sin embargo, las actividades total y específica aumentan con la adaptación al frío. En comparación con los datos de algunos autores sobre LDH de peces, esto sería indicativo de cierto grado de compensación. Sin embargo, con la adaptación al calor, estas actividades también sufren un aumento, de forma que, si hubiese compensación, cabría esperar una disminución o, al menos, un mantenimiento de estas actividades. Por otro lado, los datos de consumo de oxígeno en este estado del desarrollo implican la existencia de compensación inversa en lo que se refiere al metabolismo. Se ha señalado que dentro de un mismo organismo, distintas -

funciones y distintos tejidos pueden mostrar modelos diferentes de aclimatación (Prosser, 1973). Sin embargo, una disminución del metabolismo general implicaría una reorganización tal que se podría esperar - disminuciones en las capacidades catalíticas de, al menos, algunos sistemas enzimáticos o la utilización del metabolismo anaerobio. No se ha medido la actividad LDH de los animales adaptados al frío a baja temperatura para comprobar si este aumento permanece o, por el contrario, se reduce, puesto que como al disminuir la temperatura la energía cinética disponible desciende y, por tanto, la tasa de catálisis de las reacciones enzimáticas (Hazel y Prosser, 1974), la - tasa de reacción alta de los animales de frío medida a 30°C, podría incluso invertirse al medirla, por ejemplo, a 10°C. Por otro lado, aunque se ha descrito un aumento general en la síntesis de proteínas en peces aclimatados al frío (Haschemeyer, 1968; 1969), - pocos son los datos que han demostrado inequívocamente cambios en la concentración de enzimas, ya que estos aumentos de actividad podrían estar originados - por alteraciones en los niveles de efectores (Burlington y Sampson, 1968).

Las actividades total y específica de D. pictus pictus en el estado 33, adaptado a $29 \pm 2^\circ\text{C}$ desde el estado de botón caudal, aumentan significativamente frente al control. La actividad específica, en estas condiciones, aumenta frente a la de los animales adaptados al frío durante 20 días. Sin embargo, la adaptación al frío desde néurula provoca un aumento - en estas dos actividades superior al de la adaptación al calor. Un poiquiloterma acuático con una respuesta en el consumo de oxígeno como la de las larvas de D. pictus pictus en el estado 33, presenta una mayor demanda de oxígeno a medida que sube la temperatura - del medio ambiente, el cual se va haciendo relativa-

mente más hipóxico, de forma que si la homeostasis -
circulatoria y respiratoria fuera insuficiente, se -
produciría un aumento del metabolismo anaerobio, con
el consecuente aumento en la actividad LDH. Algunos
autores han observado que los peces no sufren gran--
des cambios en sus niveles de actividad enzimática,
de LDH entre otras enzimas, inducidos por cambios en
la tensión de oxígeno dentro de los niveles natura--
les (Shaklee et al. 1977).

En trabajos iniciados en nuestro laboratorio
y pendientes de confirmación, se ha podido observar
que la Km para lactato de las isoenzimas de LDH de -
D. pictus pictus parece mostrar un comportamiento -
frente a la temperatura en forma de U. Esto es, la -
Km a 20°C tiene un valor mínimo para todas las isoen--
zimas, sin alterarse el orden creciente de esta cons--
tante de LDH₁ a LDH₅, mientras que a 10 y a 30°C --
muestran valores superiores a los de 20°C. De esta -
forma, el complejo LDH sería más eficaz, por lo me--
nos respecto a la oxidación de lactato, a 20°C. Si -
esto resultara cierto, y si el efecto de la alta tem--
peratura sobre la actividad enzimática no fuera ca--
paz de compensar el descenso de afinidad por el subs--
trato, el aumento de actividad específica y total ob--
servado podría ser el resultado de una compensación
de la pérdida de eficacia que sufriría este complejo
enzimático a baja y alta temperatura.

Los resultados de la actividad específica en
el D. pictus pictus adulto son distintos, y en cierto
modo opuestos, a los encontrados en las larvas al es--
tado 33, en lo que se refiere a la adaptación al frío.
La realidad fisiológica de la misma especie en dos e--
tapas diferentes de su ciclo vital, es, posiblemente,
muy distinta y, por lo tanto, las respuestas a un es--
tímulo similar, no tendrían por qué ser iguales. El
animal adulto parece reducir su actividad espontánea

en mayor grado que el animal en el estado 33, según se ha podido observar.

Según han descrito multitud de autores, LDH está presente en la mayoría de los vertebrados como un sistema formado por varias isoenzimas diferentes, siendo cinco el número de estas más común. In vitro, uno de estos tipos de isoenzimas, el H o LDH₁, se inhibe con concentraciones altas de piruvato, en con--traste con otro tipo, el M o LDH₅. La LDH₁ tiene mayor afinidad por el piruvato y por el lactato que la LDH₅. Basándose en estas observaciones y en la distribución de las isoenzimas en los tejidos, se desarro--lló la teoría "aerobia-anaerobia", según la cual, la LDH₁ sería una isoenzima más capacitada para funcio--nar en tejidos con un metabolismo aerobio predomi--nante, tales como el cardíaco y el renal, tejidos en los que abunda esta isoenzima, mientras que LDH₅ lo estaría para funcionar en tejidos con un metabolismo anaerobio predominante, como el músculo esquelético, pue--to que sería capaz de catalizar la reducción del pi--ruvato frente a altas concentraciones de este. Por o--tro lado, se ha propuesto que la LDH₁ está adaptada especialmente para catalizar la oxidación de lactato a piruvato (Kaplan y Goodfriend, 1964; Everse y Ka--plan, 1975).

En D. pictus pictus se ha observado que la - distribución de las isoenzimas de LDH en los distin--tos tejidos es similar a la descrita en otros verte--brados, así como el número de estas, cinco, separa--bles en electroforesis en gel de poliacrilamida (A--lonso y Torrellas, 1973): el músculo esquelético po--see casi exclusivamente LDH₅, mientras que el corazón y el riñón muestran un predominio de las isoenzimas con mayor cantidad de subunidades H (LDH₁ y LDH₂), - las más anódicas. Con respecto a otros tejidos, el -

hígado muestra un modelo intermedio con ligera predominancia de las subunidades M, semejante también al descrito en otros vertebrados, mientras que el cerebro posee un modelo intermedio con ligero predominio de las subunidades H.

Se ha constatado la existencia de otras cualidades en el músculo esquelético y el cardíaco que parecen confirmar la aplicación de la teoría "aerobia-anaerobia" de la LDH en estos tejidos de D. pictus pictus (de Costa et al. 1978). Así, se ha observado que el músculo cardíaco presenta mayor número de mitocondrias con crestas más complejas que el músculo esquelético, lo cual puede ser indicativo de un metabolismo más aerobio del tejido del miocardio.

Una alternativa a la estrategia de la producción de más moléculas enzimáticas a baja temperatura es la de la síntesis de moléculas cualitativamente diferentes, que son mejores catalizadores a baja temperatura que las variantes enzimáticas presentes en los individuos aclimatados al calor. De acuerdo con esta hipótesis, el proceso de aclimatación se caracterizaría por una reestructuración bioquímica mayor del organismo, de manera que se producirían las moléculas adecuadas en las cantidades adecuadas y en el tiempo adecuado para asegurar la constancia de la función biológica frente a las condiciones fluctuantes del medio ambiente (Hazel y Prosser, 1974). Esta es, en síntesis, la teoría de las dos estrategias: - la de la "proteína euritolerante" y la de las "múltiples variantes" (Hochachka y Somero, 1973; Somero, 1972; 1975).

En pocos casos está completamente claro que las temperaturas ambientales reducidas induzcan la síntesis de nuevas isoenzimas que no estuvieran presentes en el estado aclimatado al calor, o, al menos,

presentes en pequeñas cantidades. Así, en el caso - del pez Idus idus aclimatado a 10 y a 20°C, el único tejido que mostró inducción específica de isoenzimas con la temperatura fué el hígado (Künnemann, 1973). Se ha descrito la desaparición de las isoenzimas 1 y 2 en el hígado de ciprino al transferir el animal de 4-5°C a 20-22°C (Hochachka, 1965), pensándose que esta desaparición está causada por una acción directa de la temperatura ambiental elevada en la configuración de la proteína enzimática (Hochachka, 1966; 1967); el proceso sintético estaría controlado por la temperatura ambiental, diferenciándose dos tipos de enzimas: las de frío, con valores de Km más bajos en el frío, siendo más adecuadas para funcionar a estas temperaturas con niveles fisiológicos de sustrato, y las de calor. Más recientemente, se ha sugerido - que estos cambios tienen un origen en el polimorfismo genético de este pez, en lugar de en la variación fenotípica inducida por el ambiente, de forma que no hay alteraciones consistentes en el modelo de isoenzimas inducido por la aclimatación a la temperatura (Wilson et al. 1973; Shaklee et al. 1977). En otros casos, se ha apuntado la posibilidad de encontrar alteraciones cuantitativas en el contenido de isoenzimas a causa de la adaptación térmica en peces (Wilson et al. 1975; Shaklee et al. 1977).

Por otro lado, se ha observado en algunos mamíferos hibernantes que este proceso induce cambios cuantitativos en el contenido de isoenzimas de LDH, detectándose un aumento de las subunidades M en el corazón y cerebro, pero no en el hígado, del erizo durante la hibernación (Olsson, 1975). También se ha apuntado un descenso en la tasa LDH-H/LDH-M durante la hibernación en hígado, corazón y cerebro, pero no en músculo esquelético, de ardillas, siendo solo significativo en el caso del corazón (Burlington y Sampson, 1968). Si se mide a 32°C, la actividad total y la ac

tividad de las subunidades M aumentan marcadamente en el hígado, corazón y cerebro en los animales en hibernación; sin embargo, si estas actividades se miden a 15°C, no se observan diferencias aparentes en el cerebro y el corazón, aunque en este último se sigue detectando un aumento en la actividad de las subunidades M. Estos cambios se explican, en principio, por la disminución del oxígeno disponible en los tejidos y/o en las células de los animales en hibernación, los cuales presentan un aumento en el metabolismo anaerobio del tejido cardíaco; el aumento de la actividad LDH M total en el hígado se explica como reflejo de una mayor utilización de lactato para la gluconeogénesis, puesto que la capacidad de metabolismo anaerobio de este tejido no varía apreciablemente durante la hibernación en estos animales. El aumento de la actividad total se supone de acuerdo con los cambios conformacionales de la enzima que resultasen de las fluctuaciones de efectores durante el ciclo de la hibernación, en lugar de con un aumento en la síntesis proteica, puesto que se ha demostrado que, en los mamíferos hibernantes, la baja temperatura deprime la síntesis proteica (Burlington y Sampson, 1968).

Otros trabajos apuntan distintas propiedades cinéticas a las mismas isoenzimas de LDH dependiendo de la temperatura a la que se midan éstas. Así, las isoenzimas de LDH del músculo esquelético del pez Gillichthys mirabilis, capacitan a este para trabajar como "músculo cardíaco", según la teoría "aerobia-anaerobia", a bajas temperaturas ambientales, condiciones de tensión de oxígeno relativamente alta, puesto que la Km aparente de las isoenzimas de LDH de este tejido disminuye a bajas temperaturas y la inhibición por sustrato (piruvato) aumenta a concentraciones fisiológicas de este (Somero, 1973). A temperaturas superiores a los 20°C, el efecto se invierte, funcionando entonces el músculo esquelético blanco como un

verdadero músculo esquelético. No se encontraron cambios de éstos parámetros inducidos por la aclimatación de los animales a distintas temperaturas, ni diferencias substanciales en el porcentaje de las isoenzimas del músculo cardíaco ni esquelético con la aclimatación, aunque en el hígado, la baja temperatura parece que hace desaparecer casi por completo las bandas de actividad LDH, cambios relacionados posiblemente con las variaciones morfológicas que presenta este tejido.

También se ha podido observar que las isoenzimas de LDH más anódicas que desaparecen en el hígado de ciprino transferido de baja a alta temperatura (Hochachka, 1965), reaparecen cuando el proceso de aclimatación a 20-22°C se completa (Tsukuda y Ohsawa, 1974). Además, se ha demostrado que la aclimatación a 18°C durante dos meses de ciprinos, produce un aumento de las actividades relativas de las LDH₅ y LDH₄ hepáticas cuando se comparan con las de animales aclimatados durante dos meses a 28°C; la diferencia entre estas actividades es mayor si se comparan las de los peces aclimatados a 18°C y medidas a 18°C con las de los animales aclimatados a 28°C y medidas a 38°C (Tsukuda, 1975). Esto se explica como que a baja temperatura hubiera unas condiciones más favorables para el funcionamiento de las isoenzimas 4 y 5.

Por otro lado, se ha descrito un modelo típico de 5 isoenzimas de LDH en el músculo esquelético del pez ciprinidontiforme Fundulus heteroclitus recién capturado; el mantenimiento de estos peces durante 8 semanas a 20 y 30°C, provoca un aumento de las isoenzimas 4 y 5 en el músculo, mientras que los animales mantenidos a 4°C, no mostraron cambios frente a los recién capturados. El aumento en la producción de las isoenzimas 4 y 5 a alta temperatura se piensa que está originado por una elevación de la

glucolisis muscular, con reducción de piruvato, producido en mayores concentraciones, y oxidación de NADH catalizadas efectivamente por las isoenzimas 4 y 5 (Bolaffi y Booke, 1974), concluyéndose que podrían afectar a la expresión de las isoenzimas de LDH otros factores ambientales (por ejemplo, la salinidad), puesto que hay diferencias entre los animales recién capturados y los mantenidos a 20°C.

En otro pez, Semotilus atromaculatus, no se han observado grandes variaciones en el modelo de 11 isoenzimas de LDH presente en el hígado inducidas por la temperatura de aclimatación, aunque sí se encontraron variaciones al parecer inducidas por la combinación de los factores temperatura y fotoperiodo: desaparición de la isoenzima 10 en la adaptación a 5°C y 16 horas de luz y 8 de oscuridad y la inversión entre la intensidad de las isoenzimas 10 y 11 en los peces de 5°C y 8 h luz y 16 h oscuridad. Se concluye que los resultados sugieren que la inducción de isoenzimas, como mecanismo molecular de la compensación térmica, puede que esté limitada a enzimas específicas de tejidos específicos, tales como el hígado, en determinados animales, y que el fotoperiodo indudablemente tenga también algún papel en la compensación térmica a nivel molecular (Kent y Hart, 1976).

Los trabajos sobre la influencia de la adaptación a la temperatura en las isoenzimas de LDH en anfibios anuros son menos abundantes, quizás debido a que, en el género Rana, no es frecuente encontrar las cinco isoenzimas típicas de otros vertebrados. En los electroferogramas de LDH purificada de músculo esquelético de Rana pipiens se ha observado una banda de actividad correspondiente, al parecer, al tetramero M₄; mientras que en el corazón aparecen dos bandas de actividad, presumiblemente de M₄ y M_{3H}. Los elec-

troferogramas de extractos crudos de corazón muestran cinco bandas de actividad, siendo muy tenues las correspondientes a las tres isoenzimas más anódicas. - No se observaron diferencias entre los modelos de isoenzimas de las ranas aclimatadas al frío y las mantenidas a la temperatura ambiente, lo cual se explica como indicativo de que Rana pipiens no altera su producción de isoenzimas como recurso de la compensación térmica. Sin embargo, se apreció un aumento en la sensibilidad a la inhibición por piruvato en las ranas aclimatadas al frío, más notorio en la LDH muscular; la Km para piruvato de la LDH de músculo de los animales aclimatados al frío se aproxima a los valores de la enzima cardiaca, especialmente cuando las temperaturas de medida son bajas. Se sugiere la posibilidad de producción de la isoenzima 4 en las ranas aclimatadas al frío, pero en niveles no detectables en la electroforesis en gel de poliacrilamida ni por los métodos de ensayo de actividad utilizados. No se observaron diferencias en la Km de la enzima de corazón, siendo posible que las isoenzimas de este tejido sean más sensibles in vivo a la inhibición que lo que se evidencia en los experimentos, realizados con la enzima purificada. Se tiene en cuenta que en las condiciones de aclimatación, el suministro de oxígeno a los animales es relativamente completo y que su actividad es baja (Enig et al., 1976). Sin embargo, no se miden cambios cuantitativos en la distribución de las isoenzimas.

También se ha encontrado una disminución significativa en la razón de los componentes más anódicos (LDH_1 y LDH_2) de las isoenzimas de LDH a el más catódico (LDH_5) en los hígados del anuro de vida acuática Xenopus laevis aclimatados a 14,5-15°C durante 1 mes frente a los aclimatados durante 24 días a 24,5-25,5°C, después de un periodo, en ambos casos, de 3 semanas de adaptación a 19°C. Se observan unos

cambios similares en cultivos in vitro de células de origen hepático y renal de X. laevis expuestos a 8 y 24°C, descendiendo en un 60% las isoenzimas anódicas en el caso del primer tipo de cultivo y en un 50% en el caso del segundo con la exposición al frío, siendo en estos experimentos los zimogramas menos limpios - que en los de aclimatación del animal. Se sugiere, además de la influencia directa de la temperatura en las células al menos en una reacción primaria, que el cambio debido a la aclimatación a una temperatura puede no ser una mera expresión del efecto de la presión parcial de oxígeno, puesto que aumentan los componentes catódicos cuando el cultivo de células se realiza a baja temperatura, donde la pO_2 es relativamente alta. Sin embargo, la aparición del tipo de isoenzimas del corazón en los cultivos adaptados al frío con cierta intensidad, se explica como debido posiblemente a un efecto de la alta pO_2 (Tsugawa, - 1976).

En los experimentos realizados en nuestro laboratorio sobre las variaciones inducidas por la baja temperatura en la actividad relativa de las isoenzimas de LDH de hígado, corazón y cerebro de hembras adultas de D. pictus pictus, no se ha detectado la aparición de ninguna isoenzima nueva, aunque sí se han apreciado cambios cuantitativos en los porcentajes de las ya existentes, con un cierto paralelismo entre los distintos tejidos. Así, en la adaptación experimental al frío descienden los porcentajes de las isoenzimas 1 y 2 en el corazón y el hígado, mientras que hay un aumento significativo en la LDH_4 y LDH_5 en corazón y LDH_3 en cerebro. Si se compara la respuesta de los tejidos en la adaptación experimental al frío y en la aclimatización al invierno, se observan tendencias paralelas en los tejidos homólogos, excepto en el cerebro; sin embargo el único cambio significativo común es el descenso de la LDH_1 en el hígado.

do. La falta de similitud entre las variaciones en los tejidos de los animales de un mismo grupo de experimentos podría tener su origen en las distintas reorganizaciones metabólicas que ocurren en los diferentes tejidos (Shaklee et al. 1977). Las diferencias que se observan en las respuestas de las mismas isoenzimas de tejidos homólogos con la adaptación experimental y con la aclimatización al frío podría atribuirse a que el grupo adaptado experimentalmente está también sometido a ayuno y obscuridad, mientras que, como se ha podido observar, los animales de invierno, aunque reducen la actividad espontánea y, con ello, la frecuencia de alimentación comparados con los de verano, no están sometidos a un ayuno total y, a pesar de estar ocultos, estarían influidos por el fotoperiodo natural.

Sobre las variaciones en el porcentaje de isoenzimas se han calculado las diferencias en las cantidades relativas de las subunidades H y M. Los resultados obtenidos de esta forma son más homogéneos en cuanto a la respuesta de los tejidos de un mismo grupo de experiencias. Así, en el hígado y el corazón de los animales adaptados experimentalmente se ha observado un aumento significativo en el porcentaje de las subunidades M, mientras que en el caso del cerebro no hay cambios significativos. Con respecto a los animales de invierno, se ha visto que hay un aumento significativo en el porcentaje de subunidades M solo en el cerebro, mientras que en los otros tejidos, en los que se aprecian diferencias en cuanto a la actividad relativa de algunas isoenzimas (descenso significativo de LDH_1 en el hígado y aumento significativo de LDH_3 en el corazón), el porcentaje de las subunidades M tiende a aumentar, pero no significativamente. Estas diferencias entre la respuesta de las subunidades al frío en los dos grupos de experimentos podría estar relacionada con las diferencias en la a

alimentación que se han apuntado mas arriba.

Se han encontrado resultados similares en la adaptación de larvas de D. pictus pictus en el estado 33, observándose en los experimentos realizados en - nuestro laboratorio una disminución de la LDH₁ y un aumento de LDH₅, cambios que son progresivos con el mayor tiempo de adaptación al frío en los dos grupos de experimentos realizados. También se observa un aumento de la LDH₄ y en la LDH₃ en todos los grupos adaptados al frío, que es significativo en la mayoría de los casos. El porcentaje de las subunidades M también aumenta con la adaptación al frío significativamente en todos los casos observados, siendo este aumento progresivo y paralelo al tiempo de adaptación. En estos casos, sería posible hablar de un aumento absoluto, puesto que, como se ha visto, la adaptación al frío provoca también un aumento en las actividades total y específica, aunque estas se han determinado utilizando piruvato como substrato.

En los experimentos de adaptación al calor - de larvas de D. pictus pictus en el estado 33 realizados en nuestro laboratorio, se observan algunos cambios en los porcentajes de isoenzimas de LDH opuestos, en cierto modo, a los observados en la adaptación al frío; así, se apreció un descenso significativo en la actividad relativa de la LDH₅, la cual se redujo hasta más de la mitad de la de los animales - controles, y un aumento significativo de la LDH₂. Sin embargo, se detectaron también un aumento de las isoenzimas 3 y 4 y una disminución de LDH₁, cambios también encontrados en la adaptación al frío. No obstante, las variaciones en el porcentaje de subunidades, con respecto al grupo control, no resultaron significativas.

Los resultados obtenidos en nuestros experi-

mentos de adaptación al frío están de acuerdo con los reseñados por otros autores en mamíferos (Burlington y Sampson, 1968; Brush, 1968; Olsson, 1975); sin embargo, parece haber diferencias substanciales en cuanto al origen sugerido para estas variaciones, a parte de los achacables a la diversidad filogenética entre los animales objeto de experimentación. Se ha argumentado que, durante la hibernación en mamíferos, hay un aumento del metabolismo anaerobio. Este puede que no sea el caso de D. pictus pictus, anfibio anuro; aunque este animal durante la adaptación al frío disminuya su actividad espontánea, la disponibilidad de oxígeno crecería relativamente en el medio acuático, y en el medio aéreo permanecería igual al menos, sobre todo en los animales adaptados experimentalmente, con lo cual, disponen de suficientes cantidades de oxígeno para no estar obligados a utilizar el metabolismo anaerobio. No se dispone de datos referentes al consumo de oxígeno de D. pictus pictus adulto adaptado al frío, pero por homología con otros anuros, es de esperar que esta actividad se vea reducida en estas condiciones. En las larvas en el estado 33, se ha observado un descenso en el consumo de oxígeno paralelo al de la temperatura, el cual se acentúa con la adaptación al frío. No se dispone de datos que relacionen la disminución en el consumo de oxígeno con un aumento en el metabolismo anaerobio, si bien se ha descrito un efecto de compensación parcial en la succinoxidasa de hígado de Rana temporaria adulta, enzima relacionada con la cadena de transporte de electrones, con la aclimatación a 8 y 22°C (Smith, 1973).

Por otro lado, los resultados sobre los cambios en los porcentajes de subunidades M inducidos por la adaptación al frío obtenidos en este trabajo, están de acuerdo con algunas de las observaciones realizadas en peces, concretamente en ciprino (Tsukuda, 1975), en las que se concluye que el aumento de

las isoenzimas LDH₅ y LDH₄ se debe a un funcionamiento mejor de estas isoenzimas a baja temperatura. Estos datos están de acuerdo con las observaciones realizadas en Xenopus laevis, concretamente en hígado de animales adultos, de manera que, aunque este anuro es acuático, es un anfibio muy relacionado filogenéticamente con D. pictus pictus. El aumento observado en el contenido de subunidades M en estos experimentos se piensa que puede no ser una mera expresión del efecto de la tensión de oxígeno del medio, puesto que este aumento, provocado por la aclimatación al frío, que se produce en un medio cuya presión parcial de oxígeno es relativamente alta sería contradictorio de la teoría "aerobia-anaerobia", abogando entonces por que las isoenzimas más catódicas, en el caso de X. laevis, son algo más adecuadas que el resto de los componentes del sistema LDH para funcionar a baja temperatura (Tsugawa, 1976).

En la adaptación al calor de las larvas de D. pictus pictus en el estado 33 cabría esperar, entonces, un aumento en el porcentaje de subunidades H en comparación con los controles, lo cual no ocurre según se ha visto.

Experimentos recientemente iniciados en nuestro laboratorio parecen indicar un aumento en la actividad relativa de las isoenzimas catódicas de la LDH de D. pictus pictus al descender la temperatura de medida de esta actividad, y un descenso en la concentración de lactato necesaria para producir cierto grado de inhibición en las isoenzimas más anódicas (LDH₁ y LDH₂) también al descender la temperatura de ensayo. Si estas dos observaciones resultaran ser correctas, se podría sugerir que las isoenzimas catódicas de la LDH de D. pictus pictus resultan relativamente más efectivas que las anódicas para funcionar a baja temperatura, según parece ocurrir también en Rana pipiens (Eby et al., 1973).

Los cambios en las actividades LDH de D. pictus descritos hasta aquí, podrían ser indicativos de ciertas reorganizaciones metabólicas, las cuales no parecen ser drásticas a juzgar por los valores obtenidos, en estos animales como consecuencia de la adaptación a la temperatura. Estos cambios podrían estar inducidos directamente por esta, obteniéndose unas ciertas ventajas funcionales en la nueva situación térmica, al aumentar la actividad relativa de las isoenzimas que son más efectivas en un cierto régimen térmico, como parece ser el caso de la adaptación al frío. La temperatura también podría inducir una reducción del metabolismo aerobio, según se desprende del descenso del consumo de oxígeno observado en las larvas en el estado 33, compensando la demanda de energía, posiblemente reducida en la adaptación al frío, con un aumento en el metabolismo anaerobio, que traería consigo un aumento en la actividad específica de la LDH, el cual se ha observado, y, según la teoría "aerobia-anaerobia", un aumento en el contenido de subunidades M de este sistema enzimático, también observado, aunque, como se ha dicho, no se dispone de datos que avalen este punto. Además, la adaptación a alta temperatura no parece producir el aumento en el contenido de subunidades H esperado según lo anterior, posiblemente debido a una disminución en la presión parcial de oxígeno del medio ambiente acuático unido a una demanda aumentada de este gas, que obligaría al animal a utilizar cierta tasa de metabolismo anaerobio en unas condiciones de temperatura que no serían idóneas para el funcionamiento de las subunidades M, con lo que la solución es intermedia: aumento de las isoenzimas de LDH intermedias (3, 4 y 2).

Por otro lado, la adaptación a distintas temperaturas puede ocasionar alteraciones en el medio interno del animal y en el intracelular tales como -

el cambio de pH, variaciones en los niveles de iones, metabolitos y efectores, en la composición lipídica de las membranas, etc., los cuales parecen ser los responsables directos de los cambios observados en algunos sistemas enzimáticos (Prosser, 1973; Hazel y Prosser, 1974; Salthé, 1975; Wilson, 1977; Valkirs, 1978), pasando a ser la temperatura un factor indirecto.

En los experimentos sobre la K_m para lactato de las isoenzimas de LDH de D. pictus pictus no se han observado diferencias significativas entre las K_m de las isoenzimas de ovario de los animales adaptados a frío y de los controles (otoño). En otros experimentos realizados en nuestro laboratorio, se ha podido apreciar una cierta semejanza entre las K_m para lactato de las isoenzimas de LDH de varios tejidos (hígado, cerebro y ovario). Esto es lógico, puesto que, teóricamente, se trata de las mismas proteínas pero sintetizadas en condiciones, y en tejidos distintos (Nisselbaum et al., 1964).

Los valores obtenidos en estos experimentos guardan cierta semejanza con los obtenidos por otros autores, aunque se trate de otras especies, principalmente mamíferos, y las condiciones sean distintas. Así, en experimentos realizados con una concentración de NAD^+ de $4,8 \times 10^{-4}M$, utilizando TRIS-Cl $0,1M$ a pH 8,7 y un intervalo de concentraciones de lactato de $0,01$ a $0,33M$, se han obtenido unos valores de K_m de 15 y $25,5 \times 10^{-3}M$ para la LDH_5 hepática y de hepatoma respectivamente; $4,7 \times 10^{-3}M$ para la LDH_2 de eritrocitos y $6,4 \times 10^{-3}M$ para LDH_1 cardíaca humanas (Nisselbaum y Bodansky, 1963). Midiendo las K_m en condiciones semejantes a las citadas inmediatamente antes, con un gradiente de concentraciones de sustrato entre $0,005$ y $0,084M$ de lactato, se obtuvieron unos valores de $14,3$ y $11,1mM$ para la LDH_5 de hígado y de -

cerebro humanos respectivamente, y de 4,1 y 3,7mM para la LDH₁ de corazón y cerebro humanos respectivamente y se concluyó que una especie de isoenzima tiene las mismas características cinéticas, independientemente del tejido de origen, dentro del mismo animal (Nisselbaum et al., 1964), utilizandose muestras purificadas de las enzimas.

Empleándose tampón TRIS-ClH en una concentración de 300 μ moles y de 0,71 μ moles de NAD[†] en un volumen final de 3 ml de solución a pH 8,9, se han obtenido unos valores de 9 y 7mM para LDH₁ de vaca y pollo respectivamente, y de 25 y 40mM para LDH₅ de vaca y pollo también, cuando las medidas se realizan a 25°C (Pesce et al., 1964). En condiciones semejantes a las anteriores, aislando y purificando también cada tipo de enzima, se han dado los siguientes valores en mM de las Km para lactato de las isoenzimas - LDH₅ de los siguientes animales: 18 en pavo (Meleagris gallopavo), 18 en faisán (Phasianus colchicus), 16 en pato (Anas platyrhynchos), 18 en ñandú (Pterocnemia pennata), 13 en avestruz (Struthio camelus), - 42 en rana toro (Rana catesbiana), 55 en lija (Squalus acanthis), 50 en lenguado del pacífico (Hippoglossus stenolepis), 50 en atún, 40 en pollo y 25 en vaca; para las isoenzimas LDH₁ de otras tantas especies se dieron los siguientes valores: 7mM en conejo, 9 en vaca y 7 en pollo (Pesce et al., 1967).

Utilizando una técnica similar a la empleada en nuestro laboratorio, se han apuntado los siguientes valores de Km para lactato de las isoenzimas de LDH de músculo esquelético de rata: LDH₁, 14,5; LDH₂, 9,5; LDH₃, 6,7; LDH₄, 5,0 y LDH₅, 2,1mM, a partir de sobrenadantes crudos y medida la actividad LDH a 37°C en tampón fosfato 0,09M pH 7,4 y con una concentración de NAD[†] de 1mM (Melendez y Municio, 1972).

También se han dado valores de 18 y 2,9mM para las Km para lactato de las LDH₅ y LDH₁ humanas - respectivamente, mientras que en vaca se han dado - valores de 14 y 5mM (Masters y Holmes, 1975). En la bibliografía disponible, no se han encontrado más datos referentes a la Km para lactato de las isoenzimas 2, 3 y 4.

La mayoría de los datos expuestos guardan cierta relación con los observados en nuestro laboratorio sobre la Km para lactato de las isoenzimas de LDH de D. pictus pictus, si no en el intervalo de valores, cuyas diferencias podrían estar originadas por la diversidad de condiciones, si en un aspecto: la mayoría coincide en dar valores más bajos de Km para lactato a la LDH₁ y los más altos a la LDH₅ dentro de la misma especie de animal, lo cual puede ser un dato más para asegurar que la denominación dada a las bandas de actividad LDH observadas en los zimogramas de D. pictus pictus, análoga a la empleada en otros vertebrados. La semejanza de valores puede dar cierta confianza en el método utilizado.

Por otro lado, se ha podido observar cierto grado de inhibición en las isoenzimas de LDH de Disco glossus pictus pictus producida por las altas concentraciones de sustrato, que afecta con mayor intensidad a LDH₁, con menor a LDH₂ y, circunstancialmente, a las restantes isoenzimas. Esta inhibición se ha apreciado con concentraciones de lactato del orden de 0,77M y, en menor grado, con 0,39M, es decir, las concentraciones más altas utilizadas en estos experimentos, las cuales están, al parecer, muy por encima de las fisiológicas (Vesell, 1975).

Se ha detectado, en muchos casos, variabilidad polimórfica en las isoenzimas de LDH, con una expresión más clara en LDH₅ y LDH₁. Concretamente, en

anfibios del género Rana (R. pipiens y R. palustris; Salthe, 1969) se han encontrado 11 variantes de LDH₁ relacionadas con una distribución geográfica determinada; se sugiere que la existencia de estas variantes se debe a distintos alelos del locus H, determinantes de la síntesis de las subunidades H. Por otro lado, se ha detectado la presencia de tres genes alelos que codifican para las subunidades H en dos subespecies de Rana pipiens (Wright y Moyer, 1968). En nuestros experimentos, se ha podido apreciar que, -- probablemente, el tipo rápido de la LDH₅ es el más abundante en la zona donde se capturaron los animales adultos. Aunque no se pudo determinar el tipo de LDH₅ de los padres de la puesta nº3, la cual resultó con una proporción de animales con LDH₅ rápida-intermedia-lenta muy similar a la 1:2:1, en trabajos recientemente realizados en nuestro laboratorio, se ha observado que la primera generación filial de un padre con LDH₅ intermedia y una madre LDH₅ lenta, resultó con una proporción de 5 animales con LDH₅ lenta y ninguno de los restantes tipos en el estado de gástrula y en el de botón caudal, mientras que en el estado 33 se observaron 7 animales con LDH₅ intermedia, 9 con LDH₅ lenta y ninguno con LDH₅ rápida. Junto con estas observaciones, se ha podido constatar que, en los animales adultos, todos los tejidos pertenecientes al mismo individuo muestran idéntico tipo de LDH₅.

De lo anteriormente expuesto se ha deducido que el tipo de LDH₅ es una característica genética - dependiente, en el más sencillo de los casos, de dos alelos con dominancia intermedia que gobiernan la síntesis de dos tipos de subunidades M, a los cuales se podría denominar M y M', que se combinan al azar, de forma que el tetramero M⁴ sería la LDH₅ rápida y el M'⁴ sería la LDH₅ lenta, siendo la LDH₅ intermedia - el conjunto de enzimas formado por la combinación al

azar de las subunidades M y M' (M₄, M₃M', M₂M'₂, etc.), con lo que este tipo de isoenzima produciría una banda más ancha en el zimograma que los otros dos tipos, en la cual sería probable la distinción de sub-ban--das, puntos que han sido observados en nuestros experimentos. La combinación al azar de estos tipos de subunidades con la subunidad H daría lugar a una serie de zimogramas característicos. Así por ejemplo, el tetrámero M₂H₂ tendría una velocidad electroforética mayor que el tetrámero M'₂H₂. En los animales - en cuyas células estuvieran presentes los dos tipos de subunidades M, la situación sería más compleja, de manera que, por ejemplo, la LDH₃ sería el siguiente conjunto de tetrámeros: M₂H₂, MM'H₂ y M'₂H₂, con una proporción 1:2:1, con lo cual, el zimograma mostraría una LDH₃ más ancha que en los otros dos casos; en - nuestros experimentos se han podido comprobar estos - tres puntos. Por lo tanto, se puede concluir que la subunidad M de las isoenzimas de LDH de D. pictus pictus variedad a manchas está presente como dos variantes: M y M', dependientes, al parecer, de dos tipos de alelos del locus M, y que los genes LDH paternos comienzan a expresarse ~~fenotípicamente~~ después del estado de botón caudal. Sin embargo, aún se necesita--rían más pruebas para que esta hipótesis fuera indu--dable.

-CONCLUSIONES.-

1.-La adaptación al frío ($8\pm 2^{\circ}\text{C}$) hace descender significativamente la frecuencia cardiaca de los animales adultos y larvas al estado 33 del desarrollo de Discoglossus pictus pictus variedad a manchas.

2.-El consumo de oxígeno de las larvas en el estado 33 de Discoglossus pictus pictus adaptadas al frío es significativamente menor que el de las larvas mantenidas a temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$) cuando se mide a 10, 20 y 25°C . Este efecto se ha relacionado con un mantenimiento de las reservas metabólicas.

3.-La Q_{10} para el consumo de oxígeno de Discoglossus pictus pictus en el estado 33 del desarrollo, es próximo a 2 entre 10 y 20°C en los animales adaptados al frío. En los animales adaptados a temperatura ambiente, la Q_{10} entre estas temperaturas es menor. Estos resultados se han relacionado con una capacidad de compensación instantanea más baja en los animales de frío.

4.-La adaptación al frío a largo plazo durante el periodo larvario altera la relación entre crecimiento y morfogénesis, puesto que se observa un retraso en el desarrollo larvario paralelo a un aumento en el tamaño corporal en los animales adaptados al frío desde el estado de néurula.

5.-La actividad específica de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) disminuye significativamente en el tejido cardiaco de Discoglossus pictus pictus adulto adaptado experimentalmente al frío. Esta actividad disminuye, aunque no significativamente, en los animales adultos durante el invierno. Estos

resultados se han relacionado con la disminución observada en la frecuencia cardiaca.

6.-Las actividades específicas de la enzima LDH de hígado y cerebro de los animales adultos adaptados experimentalmente al frío y de los de invierno no muestran variaciones significativas en relación con sus respectivos controles.

7.-La actividad específica de LDH de Discoglossus pictus pictus al estado 33 experimenta un aumento significativo en las larvas adaptadas al frío en relación con las mantenidas a temperatura ambiente.

8.-En los tejidos de los animales adultos, excepto en el cerebro de los de adaptación experimental, y en las larvas completas en el estado 33 de Discoglossus pictus pictus aumenta el porcentaje de subunidades M con la adaptación al frío. Este aumento se debe al descenso de la actividad de las isoenzimas con mayor proporción de subunidades H en el caso del tejido cardiaco, puesto que la actividad específica en este tejido disminuye con la adaptación al frío. En el caso de las larvas, este aumento en el porcentaje de subunidades M se debe a una mayor actividad de las isoenzimas con mayor proporción de subunidades M, puesto que la actividad específica aumenta con la adaptación al frío.

9.-La adaptación al calor ($29 \pm 2^\circ\text{C}$) aumenta la actividad específica de la enzima LDH en las larvas en el estado 33 de Discoglossus pictus pictus.

10.-La adaptación al calor no altera el porcentaje de subunidades M del conjunto de isoenzimas de LDH en las larvas en el estado 33.

11.-Las variaciones observadas en las actividades

dades de la LDH durante el periodo larvario de Discoglossus pictus pictus adaptados a varias temperaturas podrían ser una consecuencia de la interacción de tres factores: las variaciones en la presión parcial de oxígeno del medio, los cambios en las propiedades cinéticas de las isoenzimas y una alteración en la razón de metabolismo aerobio/anaerobio. El resultado de esta adaptación sería el mantenimiento de unos niveles adecuados de actividad glucolítica.

12.-Las diferencias entre las respuestas de las actividades específicas de la LDH de los tejidos del animal adulto y de las larvas completas en el estado 33 con la adaptación al frío, podrían estar relacionadas con una mayor reducción de la actividad espontánea del adulto frente al frío y a una mayor capacidad de respuesta, con menores costos energéticos, de los animales adultos.

13.-Los valores de Km para lactato de las isoenzimas de LDH de Discoglossus pictus pictus, medidos a 36°C, se ajustan a los obtenidos por otros autores en diversas especies. Estos valores no varían con la adaptación al frío, por lo que se deduce que no hay inducción de nuevas isoenzimas.

14.-Se han detectado dos variantes, de origen genético, en las subunidades M de LDH de Discoglossus pictus pictus. Esta subunidad parece depender de dos alelos de dominancia intermedia que gobiernan la síntesis de dos tipos de subunidades M: M (rápida) y M' (lenta).

BIBLIOGRAFIA

- ACEBAL, C.; CASTRO, J.; MELENDEZ, E. y MUNICIO, A.M.
(1974), *Int. J. Biochem.* 5: 23.
- ADAMS, M.J.; FORD, G.C.; LEIKOEK, R.; LENTZ, P.; MC
PHERSON, A.; ROSSMANN, M.G.; SMILEY, I.E.; SCHU-
VITZ, R.W. y WONACOTT, A.J. (1970), *Nature*, 227:
1098.
- AGOSTINI, A.; VERGANI, C. y VILLA, L. (1966), *Nature*
209: 1024.
- ALEKSIUK, M. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, 39A:
495.
- ALEKSIUK, M. (1971b), *Comp. Biochem. Physiol.*, 40B:
671.
- ALONSO, M. (1973), *Rev. Esp. Fisiol.*, 29: 125.
- ALONSO, M. y REYERO, C. (1972), *Rev. Esp. Fisiol.*,
28:51.
- ALONSO, M. y TORRELLAS, A. (1973), *Acta Embryol. Exp.*,
313.
- ALONSO, M., BUENO, R. y DE COSTA, J. (1976), *Acta Em-
bryol. Exp.*, 345.
- ALTMAN, M. y ROBIN, E.D. (1969), *Comp. Biochem. Phy-
siol.*, 30: 1179.
- APELLA, E. y MARKERT, C.L. (1961), *Biochem. Biophys.
Res. Commun.*, 6: 171.
- AUDILET, D.O. y GRAY, I. (1973), *Cryobiology*, 10: 308.
- AUERBACH, S. y BRINSTER, R.L. (1967), *Exp. Cell. Res.*,
46: 89.
- BAILEY, G.S. y LIM, S.T. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252:
5708.
- BAILEY, G.S. y WILSON, A.C. (1968), *J. Biol. Chem.*,
243: 5843.
- BALDWIN, J. (1975), *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B: 33.
- BALDWIN, J. y HOCHACHKA, P.W. (1970), *Biochem. J.*,

- BALDWIN, J. y TEMPLE-SMITH, P. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B: 805.
- BALDWIN, J.; STOREY, K.B. y HOCHACHKA, P.W. (1975), *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B: 19.
- BARANSKA, J. y WLODAWER, P. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 553.
- BAUR, E.W. y PATTIE, D.L. (1968), *Nature*, 218: 341.
- BEALL, R.J. y PRIVITERA, C.A. (1971), *Amer. J. Physiol.*, 224: 435.
- BEHRISH, H.W. (1972), *Marine Biol.*, 13: 267.
- BERGMAYER, H.V., BERNT, E. y HESS, B. (1965), en *Methods of enzymatic analysis* (ed. H.V. BERGMAYER), Academic Press, Nueva York.
- BEYER, R.E. (1972), en *Hibernation and Hypothermia, perspectives and challenges*, pags. 17-55, (ed. J. P. HANNON; J.R. WILLIS; E.T. PENGELBEY y R.N. ALPERT), American Elsevier, Nueva York.
- BLANCO, A. y ZINKHAM, W.H. (1963), *Science*, 139: 601.
- BLANCO, A.; ZINKHAM, W.H. y KUPCHYK, L. (1964), *J. Exp. Zool.*, 156: 137.
- BLIX, A.S. y FROM, S.H. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, 40B: 579.
- BOLAFFI, J.L. y BOOKE, H.E. (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, 48B: 557.
- BORAL, M.C. y DEB, C. (1966), *Comp. Biochem. Physiol.*, 18: 653.
- BRADY, A.J. (1964), en *Physiology of Amphibia*, pags. 211-250 (ed. J.A. MOORE), Academic Press, N. York.
- BRATTSTROM, B.M. (1970), en *Comparative Physiology of Thermoregulation*, pags. 135-166, (ed. G.C. Whitow), Academic Press, Nueva York.
- BRAUN, K.; KUNNEMANN, H. y LAUDEN, H. (1970), *Marine*

- BREER, H. y RAHMANN, H. (1974), Brain Research., 74: 360.
- BRINSTER, R.L. (1965), Biochim. Biophys. Acta, 110: 439.
- BRINSTER, R.L. (1967), Nature, 214: 1240.
- BRINSTER, R.L. (1967b), Biochim. Biophys. Acta, 148: 298.
- BRINSTER, R.L. (1968), J. Reprod. Fertil., 17: 139.
- BRUSH, A.H. (1968), Comp. Biochem. Physiol., 27: 113.
- BURLINGTON, R.F. y SAMPSON, J.H. (1968), Comp. Biochem. Physiol., 25: 185.
- BYRNE, J.J. y WHITE, R.J. (1975), Comp. Biochem. Physiol., 50A: 709.
- CAHN, R.D.; KAPLAN, N.O.; LEVINE, L. y ZWILLING, E. (1962), Science, 136: 962.
- CALDWELL, R.S. (1969), Comp. Biochem. Physiol., 31: 79.
- CALDWELL, R.S. y VERNBERG, J.F. (1970), Comp. Biochem. Physiol., 34: 179.
- CAREY, F.G.; TEAL, J.M.; KANNISHER, J.W.; LAWSON, K. D. y BECKETT, J.S. (1971), Amer. Zool., 11: 137.
- CLAYCOMB, W.C. y VILLEE, C.A. (1971), Develop. Biol., 24: 413.
- CORNISH, H.H.; BARTB, M.L. y DODSON, V.N. (1970), Toxicol. Appl. Pharmacol., 16: 411.
- COSSINS, A.R. (1976), Lipids, 11: 307.
- COSSINS, A.R. y PROSSER, C.L. (1977), XXVII International Congress of Physiological Sciences. Paris. Comunicación nº 427.
- COSSINS, A.R. y PROSSER, C.L. (1977b), XXVII International Congress of Physiological Sciences. Paris. Mesa redonda sobre "Adaptación metabólica -

- COSTA RUIZ, J. de; SIGUENZA, J.A.; BARJA DE QUIROGA, G.; ALONSO, M. y FRAILE, A. (1978), *Rev. Esp. Fisiol.*, (en prensa).
- COSTELLO, L.A. y KAPLAN, N.O. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, 73: 658.
- COWEY, C.B. (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, 23: 969.
- CRAMER, H. (1972), *Teoría de probabilidades y aplicaciones*. Ed. Aguilar. Madrid.
- CHANG, S.B. y MATSON, R.S. (1972), *Biophys. Res. Commun.*, 46: 1529.
- DAS, A.B. (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, 21: 469.
- DAS, A.B. y PROSSER, C.L. (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, 21: 449.
- DAVIS, B.J. (1964), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121: 404.
- DAWSON, D.M.; GOODFRIEND, T.L.; y KAPLAN, N.O. (1964), *Science*, 143: 929.
- DAWSON, D.M. y KAPLAN, N.O. (1965), *J. Biol. Chem.*, 240: 3215.
- DEAN, J.M. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, 29: 185.
- DE WILDE, M. y HOUSTON, A.M. (1967), *J. Fisheries Res. Board Can.*, 24: 2267.
- DREYFUS, J.C.; DEMOS, J.; SCHIAPIRA, F. y SCHIAPIRA, G. (1962), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 254: 4384.
- DUDMAN, N.P.B. (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36: 608.
- DUDMAN, N.P.B. y ZERNER, B. (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, 171: 195.
- DUDMAN, N.P.B. y ZERNER, B. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 310: 248.
- DUNLAP, D.G. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, 38A: 1.
- DUNLAP, D.G. (1972), *Biol. Bull.*, 143: 332.

- EBY, D.; SALTHER, S. y LUKTON, A. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 327: 227.
- EHMANN, J.D. y HULTIN, H.O. (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, 154: 471.
- EKBERG, D.R. (1962), *Comp. Biochem. Physiol.*, 5: 123.
- ENGEL, W. (1972), *Humangenetik*, 15: 355.
- ENGEL, W. y KREUTZ, R. (1973), *Humangenetik*, 19: 253.
- ENGEL, W. y PETZOLDT, V. (1973), *Humangenetik*, 20: 125.
- ENIG, M.; RAMSAY, J. y EBY, D. (1976), *Comp. Biochem. Physiol.*, 53B: 145.
- EPSTEIN, C.J.; WEGIENKA, E.A. y SMITH, C.W. (1969), *Biochem. Genet.*, 3: 271.
- EVERSE, J. y KAPLAN, N.O. (1973), en *Advances in Enzymology*, vol. 37, pags. 61-133 (ed. A. MEISTER), Academic Press, Nueva York.
- EVERSE, J. y KAPLAN, N.O. (1975), en *Isozymes II: Physiological function*, pags. 29-44 (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- FAULHABER, I. y LYRA, L. (1975), *Wilhem Roux' Archiv*, 176: 191.
- FIELDHOUSE, B. y MASTERS, C.J. (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 118: 538.
- FINE, I.H.; KAPLAN, N.O. y KUFTINEC, D. (1963), *Biochemistry*, 2: 116.
- FITZPATRICK, L.C. y ATEBARA, M.Y. (1974), *Physiol. Zool.*, 47: 119.
- FITZPATRICK, L.C.; BRISTOL, J.R. y STOKES, R.M. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, 40A: 681.
- FITZPATRICK, L.C.; BRISTOL, J.R. y STOKES, R.M. (1972), *Comp. Biochem. Physiol.*, 41A: 89.
- FLEISCHER, S.; BRIERLEY, G.; KLOUWEN, H. y SLAUTTER-

- BACK, D.B. (1972), J. Biol. Chem., 237: 3264.
- FONDY, T.P.; PESCE, A.; FREEDBERG, I.; STOLZENBACH, F. y KAPLAN, N.O. (1964), Biochemistry, 3: 522.
- FREED, J. (1965), Comp. Biochem. Physiol., 14: 651.
- FREED, J.M. (1971), Comp. Biochem. Physiol., 39B: - 747.
- FRITZ, P.J. y JACOBSEN, K.B. (1965), Biochemistry, 4: 282.
- FRITZ, P.J.; VESELL, E.S.; WHITE, E.L. y PRUITT, K. M. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62: 558.
- FRITZ, P.J.; WHITE, E.L.; OSTERMAN, J. y PRIUTT, K. M. (1974), en Proceedings joint USA-JAPAN Symposium on protein turnover, Academic Press, Nueva York.
- FRITZ, P.J.; WHITE, E.L.; PRIUTT, K.M. y VESELL, E. S. (1973), Biochemistry, 12: 4033.
- FRITZ, P.J.; WHITE, E.L. y PRUITT, K.M. (1975), en I sozymes III: Developmental Biology, pags. 347-358, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- FRITZ, P.J.; WHITE, E.L.; VESELL, E.S. y PRUITT, K. M. (1971), Nat. New Biol., 230: 119.
- FRY, F.E.J. (1967), en Thermobiology, pags. 375-409, (ed. A.H. ROSE), Academic Press, Nueva York.
- FRY, F.E.J. y HOCHACHKA, P.W. (1970), en Comparative Physiology of Thermoregulation, vol. I, pags. 79-134, (ed. G.C. WHITTOW) Academic Press, Nueva - York.
- GEORGIEV, P.; HOLMES, R.S. y MASTERS, C.J. (1970), Biochim. Biophys. Acta, 222: 155.
- GESSER, H. y POUPA, O. (1973), Comp. Biochem. Physiol., 46B: 683.
- GOLDBERG, E. (1963), Science, 139: 602.
- GOLDBERG, E. (1965), Arch. Biochem. Biophys., 109: 134.

- GOLDBERG, E. (1966), *Science*, 151: 1091.
- GOLDBERG, E. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247: 2044.
- GOLDBERG, E. y HAWTREY, C. (1967), *J. Exp. Zool.*, 164: 309.
- GOLDMAN, R.D.; KAPLAN, N.O. y HALL, T.C. (1964), *Cancer Res.*, 24: 389.
- GONZALEZ DE BUITRAGO, J.M. (1976), *Tesis Doctoral*, Madrid.
- GOODFRIEND, T.L. y KAPLAN, N.O. (1964), *J. Biol. Chem.*, 239: 130.
- GOODFRIEND, T.L.; SOKOL, D.M. y KAPLAN, N.O. (1966), *J. Mol. Biol.*, 15: 18.
- GRAINGER, J.N.R. (1960), *Verhandlungen Deutsch. Zoöl. Ges. Bonn*, 60-72.
- GRASSE, P.P. y DEVILLERS, C. (1965), *Zoologie II: Vertébrés*, ed. Masson et Cie., Paris.
- GRIFFIN, J.H. y CRIDDLE, R.S. (1970), *Biochemistry*, 9: 1195.
- GRIGG, G.C. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 1203.
- GUTTMAN, S.I. (1975), en *Isozymes IV: Genetics and Evolution*, pags. 679-699, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- HAEST, C.W.M.; DEGIER, J. y VAN DEENEN, L.M. (1969), *Chem. Phys. Lipids*, 3: 413.
- HANKE, W.; BERGERHOF, K. y NEUMANN, U. (1969), *Z. Vergl. Physiol.*, 65: 351.
- HANKE, W. y NEUMANN, U. (1972), *Gen. Comp. Endocrinol.*, Suppl., 3: 198.
- HARRI, M.N.E. (1973), *Physiol. Zool.*, 46: 148.
- HARRI, M.N.E. (1973b), en *Effects of Temperature on Ectothermic Organisms*, pags. 35-43, (ed. W. WIESER), Springer-Verlag Berlin.

HARRI, M.N.E. (1974), Reports Dept. Zool., Univ.
Turku, nº 2.

HARRI, M.N.E. (1974b), Comp. Gen. Pharmacol., 5:
305.

HARRI, M.N.E. y HEDENSTAM, R. (1972), Comp. Biochem.
Physiol., 41A: 409.

HARRI, M.N.E.; HEDENSTAM, R.; LINDGREN, E. y PUUSKA,
M. (1972), Comp. Biochem. Physiol., 43A: 545.

HARRI, M.N.E. y LINDGREN, E. (1972), Comp. Gen. Phar-
macol., 3: 226.

HART, J.S. (1957), Can. J. Zool., 35: 195.

HASCHEMEYER, A.E.V. (1968), Biol. Bull., 135: 130.

HASCHEMEYER, A.E.V. (1969), Biol. Bull., 136: 28.

HASCHEMEYER, A.E.V. (1969b), Comp. Biochem. Physiol.,
28: 535.

HASCHEMEYER, A.E.V. (1969c), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 62: 128.

HAUPT, F. y GIERBERG, H. (1958), Naturwissenschaf-
ten, 45: 268.

HAWTREY, C.O.; NAIDU, A.; NELSON, C. y WOLFE, D.
(1975), en Isozymes II: Physiological function,
pags. 171-180, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press,
Nueva York.

HAZEL, J. (1973), en Temperature Relations of Ecto-
thermic Organisms. Mechanisms and Ecology, pags.
55-68, (ed. W. WIESER), Springer-Verlag Berlin.

HAZEL, J. y PROSSER, C.L. (1970), Z. Vergleich. Phy-
siol., 67: 217.

HAZEL, J. y PROSSER, C.L. (1974), Physiol. Rev., 54:
620.

HEINICKE, E. y HOUSTON, A.H. (1965), J. Fisheries Res.
Board Can., 22: 1455.

HERMANSEN, B. y JØRGENSEN, B. (1969), Gen. Comp. En-

- HOCHACHKA, P.W. (1964), *Biochemistry*, 3: 1789.
- HINKS, M. y MASTERS, C.J. (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 130: 458.
- HOCHACHKA, P.W. (1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, 111: 96.
- HOCHACHKA, P.W. (1966), *Comp. Biochem. Physiol.*, 18: 261.
- HOCHACHKA, P.W. (1967), en *Molecular Mechanisms of Temperature Adaptation*, pags. 177-203, (ed. C.L. PROSSER), Amer. Assoc. Advan. Sci., Horn-Shafer, Baltimore.
- HOCHACHKA, P.W. (1968), *Comp. Biochem. Physiol.*, 25: 107.
- HOCHACHKA, P.W. y HAYES, F.R. (1962), *Can. J. Zool.*, 40: 261.
- HOCHACHKA, P.W. y SOMERO, G.N. (1971), en *Fish Physiology*, vol. VI, pags. 100-156, (ed. W.S. HOAR y J.D. RANDALL), Academic Press, Nueva York.
- HOCHACHKA, P.W. y SOMERO, G.N. (1973), *Strategies of Biochemical Adaptation*, Saunders Co., Philadelphia.
- HOLMES, R.S. (1972), *FEBS Letters*, 28: 51.
- HOLMES, R.S. y MARKERT, C.L. (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 64: 205.
- HOLMES, R.S. y SCOPES, R.K. (1974), *Eur. J. Biochem.*, 43: 167.
- HOLMES, R.S.; COOPER, D.W. y VANDEBERG, J.L. (1973), *J. Exp. Zool.*, 184: 127.
- HAZEL, J. (1972), *Comp. Biochem. Physiol.*, 43B: 863.
- HOLZMAN, N. y Mc MANUS, J.J. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, 45A: 833.

- 180: 13.
- HOSKINS, M.A.H. y ALEKSIUK, M. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, 45A: 737.
- HOSKINS, M.A.H. y ALEKSIUK, M. (1973b), *Comp. Biochem. Physiol.*, 45B: 343.
- HOUSTON, A.H. y DE WILDE, M.A. (1968), *J. Exptl. Biol.*, 49: 71.
- HOUSTON, A.H. y DE WILDE, M.A. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 877.
- HOUSTON, A.H.; MADDEN, J.A. y DE WILDE, M.A. (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, 34: 805.
- HOUSTON, A.H.; REAVES, R.S.; MADDEN, J.A. y DE WILDE, M.A. (1968), *Comp. Biochem. Physiol.*, 25: 563.
- HOWELL, B.J.; BAUMGARDNER, F.W.; BONDI, K. y RAHN, H. (1970), *Amer. J. Physiol.*, 218: 600.
- HULTIN, H.O.; WESTROT, C. y SOUTHARD, J.H. (1966), *Nature*, 211: 853.
- HULTIN, H.O.; EHMANN, J.D. y MELNICK, R.L. (1972), *J. Food. Sci.*, 37: 269.
- HOLZAPFEL, R.A. (1937), *Quart. Rev. Biol.*, 12: 65.
- JACOB, F. y MONOD, J. (1961), *J. Mol. Biol.*, 3: 318.
- JACOBSEN, J.B.; MURPHY, J.B. y DUNAWAY, P.B. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 1135.
- JANKOWSKY, H.D. (1960), *Z. Vergl. Physiol.*, 43: 392.
- JANKOWSKY, H.D. (1968), *Helgoländer Wiss. Weersunters*, 18: 317.
- JANKOWSKY, H.D. y KORN, H. (1965), *Naturwissenschaften*, 52: 642.
- JONES, D.R. (1972), *Comp. Biochem. Physiol.*, 41A: 97.
- JUNGREIS, A.M. (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 433.

- JUNGREIS, A.M. y HOOPER, A.B. (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 417.
- KANUNGO, M.S. y PROSSER, C.L. (1959), *J. Cell. Comp. Physiol.*, 54: 265.
- KAPLAN, N.O. y CIOTTI, M.M. (1961), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94: 701.
- KAPLAN, N.O.; CIOTTI, M.M.; HAMOLSKY, M. y BIEBER, R. E. (1960), *Science*, 131: 392.
- KAPLAN, N.O. y GOODFRIEND, T.L. (1964), *Adv. Enzyme Reg.*, 2: 203.
- KAPLAN, N.O. y WHITE, S. (1963), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 103: 835.
- KENT, J.D. y HART, R.G. (1976), *Comp. Biochem. Physiol.*, 54B: 77.
- KIRBERGER, C. (1953), *Z. Vergleich. Physiol.*, 35: 175.
- KLICKA, J. (1965), *Physiol. Zool.*, 38: 177.
- KLOSE, J.; WOLF, V.; HITZEROTH, H.; RITTER, H.; ATKIN, N.B. y OHNO, S. (1968), *Humangenetik*, 5: 190.
- KLOSE, J.; WOLF, V.; HITZEROTH, H.; RITTER, H.; ATKIN, N.B. y OHNO, S. (1969), *Humangenetik*, 7: 245.
- KNAPP, W. (1974), *Oecologia (Berl.)*, 15: 353.
- KNIPPRATH, W.G. y MEAD, J.F. (1968), *Lipids*, 3: 121.
- KOEN, A.L. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 140: 487.
- KOSKELA, P. (1975), *Publ. Disc. Dept. Zool., Fac. Sci., Univ. Oulu*, Sept. 27th.
- KOWALEWSKY, S. y ROTTHAUWE, H.W. (1972), *Z. Kinderheilk*, 113: 55.
- KUNNEMANN, H. (1973), *Marine Biol.*, 18: 37.
- KUNNEMANN, H.; LAUDIEN, H. y PRECHT, H. (1970), *Marine Biol.*, 7: 71.

- KUTUNUMA, N. (1973), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 7: 175.
- LAGERSPETZ, K.Y.H. (1974), *Biol. Rev.*, 49: 477.
- LAGERSPETZ, K.Y.H.; HARRI, M.N.E. y OKSLAHTI, R.
(1974), *Gen. Comp. Endocrinol.*, 22: 169.
- LANGVAD, E. (1968), *Europ. J. Cancer*, 4: 107.
- LEHMANN, J. (1970), *Intern. Rev. Ges. Hydrobiol.*,
55: 763.
- LEHMANN, J. (1970b), *Intern. Rev. Ges. Hydrobiol.*,
55: 413.
- LEVY, P.L. y SALTHER, S.N. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, 39B: 343.
- LINDSAY, D.T. (1963), *J. Exp. Zool.*, 152: 75.
- LINDY, S. y RAJASALMI, M. (1966), *Science, N.Y.*, 153:
1401.
- LINTHICUM, D.S. y CAREY, F.G. (1972), *Comp. Biochem. Physiol.*, 43A: 425.
- LOW, P.S.; BADA, J.L. y SOMERO, G.N. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 430.
- LOW, P.S. y SOMERO, G.N. (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, 49B: 307.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951), *J. Biol. Chem.*, 193: 265.
- LUSH, I.E. (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 23.
- LUSH, I.E.; COWEY, C.B. y KNOX, D. (1969), *J. Exp. Zool.*, 171: 105.
- MANELLI, H. y MARGARITORA, F. (1961), *Rend. Acc. Naz. dei Lincei*, XL, Serie IV, 12: 3.
- MANWELL, C. y KERST, K.V. (1966), *Comp. Biochem. Physiol.*, 17: 741.
- MARKERT, C.L. (1962), en *Hereditary Developmental and Immunological Aspects of Kidney Disease*, pag. 54, (ed. J. METCOFF), Northwestern University Press, Illinois.

- MARKERT, C.L. (1965), en *Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis*, pag. 65, (ed. M. LOCKE), Academic Press, Nueva York.
- MARKERT, C.L. (1967), 7th. Int. Congr. Biochem., Tokyo, 4: 828.
- MARKERT, C.L. (1968), Ann. N.Y. Acad. Sci., 151: 14.
- MARKERT, C.L. y APELLA, E. (1963), Ann. N.Y. Acad. Sci., 103: 915.
- MARKERT, C.L. y FAULHABER, I. (1965), J. Exp. Zool., 159: 319.
- MARKERT, C.L. y HOLMES, R.S. (1969), J. Exp. Zool., 171: 85.
- MARKERT, C.L. y MØLLER, F. (1959), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45: 753.
- MARKERT, C.L.; SHAKLEE, J.B. y WHITT, G.S. (1975), Science, 189: 102.
- MARKERT, C.L. y URSPRUNG, H. (1962), Dev. Biol., 5: 363.
- MASSARO, E.J. y MARKET, C.L. (1968), J. Exp. Zool., 168: 223.
- MASTERS, C.J. y HOLMES, R.S. (1972), Biol. Rev. Camb. Philos. soc., 47: 309.
- MASTERS, C.J. y HOLMES, R.S. (1974), Adv. Comp. Biochem. Physiol., 5: 109.
- MASTERS, C.J. y HOLMES, R.S. (1975), "Haemoglobin, isoenzymes and tissue differentiation"; (ed. A. NEUBERGER y E.L. TATUM), North Holland; American Elsevier.
- Mc WHINNIE, D.J. y OELTGEN, P.R. (1971), Comp. Biochem. Physiol., 38B: 739.
- MEISTER, E. (1950), J. Biol. Chem., 184: 117.
- MELENDEZ, E. y MUNICIO, A.M. (1972), Int. J. Biochem., 3: 482.

- MELNICK, R.L. y HULTIN, H.O. (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 33: 863.
- MELNICK, R.L. y HULTIN, H.O. (1973), *J. Cell. Physiol.*, 81: 139.
- MEWS, H.H. (1957), *Z. Vergleich. Physiol.*, 40: 345.
- MILLER, M.R. (1961), en *Comparative Physiology of Carbohydrate Metabolism in Heterothermic Animals*, pags. 125-147, (ed. A.W. MARTIN), Univ. Washington Press, Seattle, Washington.
- MILLER, N.G.A.; HILL, M.W. y SMITH, M.W. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 455: 644.
- MILLER, D.A.; STANDISH, M.L. y THURMAN, A.E.Jr. (1968), *Physiol. Zoöl.*, 41: 500.
- MOON, T.W. (1975), *Isozymes II: Physiological function*, pags. 207-220, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- MORRIS, R.W. y SCHNEIDER, M.J. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 1461.
- MORRISON, W.J. (1970), *Trans. Amer. Fish Soc.*, 99: 193.
- MORRISON, W.J. y WRIGHT, J.E. (1966), *J. Exp. Zool.*, 163: 259.
- MOYER, F.H.; SPEAKER, C.B. y WRIGHT, D.A. (1968), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151: 650.
- MURRISH, D.E. y VANCE, V.J. (1968), *Comp. Biochem. Physiol.*, 27: 329.
- NAKANO, E. y WHITELEY, A.H. (1965), *J. Exp. Zool.*, 159: 167.
- NEAVES, W.B. y GERALD, P.S. (1969), *Science*, 164: 557.
- NEIDLANDS, J.B. (1952), *J. Biol. Chem.*, 199: 373.
- NISSELBAUM, J.S. y BODANSKY, O. (1963), *J. Biol. Chem.*, 238: 969.

- NISSSELBAUM, J.S.; PACKER, D.E. y BODANSKY, O. (1964),
J. Biol. Chem., 239: 2830.
- ODENSE, P.H.; ALLEN, T.M. y LEUNG, T.C. (1966), Can.
J. Biochem., 44: 1319.
- ODENSE, P.H.; LEUNG, T.C.; ALLEN, T.M. y PARMER, E.
(1969), Biochem. Genet., 3: 317.
- OGIHARA, M. (1975), en Isozymes II: Physiological
function, pags. 157-170, (ed. C.L. MARKERT), A-
cademic Press, Nueva York.
- OHNO, S.; WOLF, V. y ATKIN, N.B. (1968), Hereditas,
59: 169.
- OLIVEIRA, R.J. y PFUDERER, P. (1973), Exp. Gerontol.,
8: 193.
- OLSSON, S.O.R. (1975), Comp. Biochem. Physiol., 51B:
5.
- ORSTEIN, L. (1964), Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 321.
- OUEDRAOGO, M.L. y CHALUMEAU-LE FOULGOC, M.T. (1973),
C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, 276: 1749.
- OWEN, T.G. y WIGSS, A.J. (1971), Comp. Biochem. Phy-
siol., 40B: 465.
- PACKARD, G.C. (1972), Physiol. Zool., 45: 270.
- PACKARD, G.C. (1972b), Physiol. Zool., 45: 310.
- PACKARD, G.C. y PACKARD, M.J. (1975), Gen. Comp. En-
docrinol., 27: 162.
- PACKARD, G.C. y RANDALL, J.C. (1976), Gen Comp. Endo-
crinol., 28: 368.
- PARVATHESWARARAO, V. (1968), Endocr. Exp., 2: 173.
- PASANEN, S. y KOSKELA, P. (1976), Publ. Univ. Joen-
suu, Ser. B II (5): 1.
- PATERSON, C. y MASTERS, C.J. (1972), J. Reprod. Fert.,
30: 425.
- PENHOS, J.C. y RAMEY, E. (1973), Amer. Zool., 13:
667.

- PESCE, A.J.; MAC KAY, R.H.; STOLZENBACH, F.E.; CAHN, R.D. y KAPLAN, N.O. (1964), J. Biol. Chem., 239: 1753.
- PESCE, A.; FONDY, T.P.; STOLZENBACH, F.; CASTILLO, F. y KAPLAN, N.O. (1967), J. Biol. Chem., 242: 2151.
- PFLEIDERER, G. y JECKEL, D. (1957), Biochem. Z., 329: 370.
- PRECHT, H. (1958), en Physiological Adaptation, pags. 50-78, (ed. C.L. PROSSER), Amer. Physiol. Soc., Washington D.C.
- PRECHT, H. (1964), Zool. Jahrb. Abt. Allgem. Zool. Physiol. Tiere, 71: 313.
- PRECHT, H (1964b), The Cell and Environmental Temperature, (ed. A.S. TROSHIN), Pergamon Press, Oxford.
- PRECHT, H.; CHRISTOPHERSEN, J.; HENSEL, H. y LARGHER, W. (1973), en Temperature and Life, pag. 779, Springer-Verlag Berlin.
- PROSSER, C.L. (1964), en Handbook of Physiology. Adaptation to the Environment, pags. 11-25, Amer. Physiol. Soc., sect. 4, Washington, D.C.
- PROSSER, C.L. (1973), Comparative Animal Physiology, ed. Saunders, Philadelphia.
- PROSSER, C.L.; MAC KAY, W. y KATO, K. (1970), Physiol. Zool., 43: 81.
- RAHN, H. (1965), en Ciba Foundation Symp., Development of the Lung, pags. 3-29, (ed. A.V.S. DE REUCK y R. PORTER), J. y A. Churchill, Londres.
- RAISON, J.K.; LYONS, J.M. y THOMSON, W.W. (1971), Arch. Biochem. Biophys. 142: 83.
- RAPOLA, J. y KOSKIMIES, D. (1967), Science, 157: 1311.
- REEVES, R.B. y WILSON, T.L. (1969), Federation Proc., 28: 872.

- ROOTS, B.I. y PROSSER, C.L. (1962), J. Exptl. Biol., 39: 617.
- ROTERMUND, A.J. y PRIVITERA, C.A. (1972), Comp. Biochem. Physiol., 41B: 511.
- RUDDLE, F.H.; CHAPMAN, V.M.; CHEN, T.R. y KLEBE, R. J. (1970), Nature, 227: 251.
- SALTHER, S.N. (1969), Biochem. Genet., 2: 271.
- SALTHER, S.N. (1975), en Isozymes IV: Genetics and Evolution, pags. 665-678, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- SALTHER, S.N.; CHILSON, O.P. y KAPLAN, N.O. (1965), Nature, 207: 723.
- SALVAT, M. (1968), Enciclopedia Salvat de las Ciencias, Tomo 5, Animales Vertebrados, Salvat, S.A. Ed., Pamplona.
- SAVITZ, J. (1969), J. Fish. Res. Board Can., 26: 1813.
- SCHOLANDER, P.F.; FLAGG, W.; WALTERS, V. e IRVING, L. (1953), Physiol. Zool., 26: 67.
- SCHWEITZER, E.S.; FARROW, F. y KNOX, W.E. (1973), Enzyme, 14: 173.
- SENSABAUGH, G.F. y KAPLAN, N.O. (1972), J. Biol. Chem., 247: 585.
- SHAKLEE, J.B. (1973), Ph. D. Thesis, Yale University, New Haven, Conn.
- SHAKLEE, J.B.; CHRISTIANSEN, J.A.; SIDELL, B.D.; PROSSER, C.L. y WHITT, G. (1977), J. Exp. Zool., 201: 1.
- SHAKLEE, J.B.; KEPES, K.L. y WHITT, G.S. (1973), J. Exp. Zool., 185: 217.
- SHAW, C.R. y BARTO, E. (1963), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50: 211.
- SHERR, C.J. (1968), J. Exp. Zool., 169: 287.

- SHERINGTON, C.S. (1906), *The Integrative Action of the Nervous System*. New Haven: Yale University Press, 2^a ed., 1947.
- SHOWS, T.B.; MASSARO, E.J. y RUDDLE, F.H. (1969), *Biochem. Genet.*, 3: 525.
- SHOWS, T.B. y RUDDLE, F.H. (1968), *Science*, 160: 1356.
- SHOWS, T.B. y RUDDLE, F.H. (1968b), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 67: 574.
- SMIT, H. (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, 21: 125.
- SMITH, C.L. (1953), *Nature*, 171: 311.
- SMITH, C.L. (1954), *J. Endocr.*, 10: 184.
- SMITH, M.W. (1966), *J. Physiol., London*, 183: 649.
- SMITH, C.L. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B: 445.
- SMITH, C.L. (1973b), *Comp. Biochem. Physiol.*, 44B: 779.
- SMITH, C.L. (1973c), *Comp. Biochem. Physiol.*, 44B: 789.
- SMITH, M.W. y KEMP, P. (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, 39B: 357.
- SOMERO, G.N. (1969), *Amer. Nat.*, 103: 517.
- SOMERO, G.N. (1969b), *Biochem. J.*, 114: 237.
- SOMERO, G.N. (1972), en *Hibernation and Hypothermia, Perspectives and Challenges*, pags. 55-80, (ed. F. E. SOUTH; J.P. HANNON; J.R. WILLIS; E.G. PENGELEY y R.N. ALPERT), American Elsevier, Nueva York.
- SOMERO, G.N. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, 44B: 205.
- SOMERO, G.N. (1975), en *Isozymes II: Physiological functions*, pags. 221-234, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.

- SOMERO, G.N.; GIESE, A.C. y WOHLSCHLAG, D.E. (1968),
Comp. Biochem. Physiol., 26: 223.
- SOMERO, G.N. y HOCHACHKA, P.W. (1969), Nature, 223:
194.
- STARKWEATHER, W.H.; COUSINEAU, L.; SCHOCH, H.K. y ZA
RAFONETIS, C.J. (1965), Blood, 26: 63.
- STARKWEATHER, W.H. y SCHOCH, H.K. (1962), Biochim.
Biophys. Acta, 62: 440.
- STIER, T.J.B. y BOCK, H.C.Jr. (1966), Proc. Soc.
Exptl. Biol. Med., 123: 149.
- SUGIMOTO, S. y NOSOH, Y. (1971), Biochim. Biophys.
Acta, 235: 210.
- SVASTI, J. y VIRIYACHAI, S. (1975), en Isozymes II:
Physiological function, pags. 113-127, (ed. C.L.
MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- SYNER, F.N. y GOODMAN, M. (1966), Nature, 209: 426.
- SYNER, F.N. y GOODMAN, M. (1969), Biochem. Genet.,
3: 457.
- TAYLOR, S.S.; OXLEY, S.S.; ALLISON, W.S. y KAPLAN, N.
O. (1973), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 1790.
- TINDAL, J.S. (1956), J. Exptl. Biol., 33: 196.
- TSUGAWA, K. (1976), Comp. Biochem. Physiol., 55B:
259.
- TSUKUDA, H. (1975), Comp. Biochem. Physiol., 52B:
343.
- TSUKUDA, H. y OHSAWA, W. (1974), Annot. Zool. Japan,
47: 206.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. y STAUFFER, J.F. (1972),
Manometric and Biochemical Techniques: A mannual
describing methods applicable to the study of ti
ssue metabolism, 5^a ed., Burgess Publishing Co.,
Minneapolis.
- UMMINGER, B.L. (1969), J. Exp. Zool., 172: 283.

- UMMINGER, B.L. (1969b), J. Exp. Zool., 172: 409.
- UMMINGER, B.L. (1970), Nature, 255: 294.
- UMMINGER, B.L. (1971), Copeia: 686.
- UMMINGER, B.L. (1971b), Comp. Biochem. Physiol.,
38A: 141.
- USHAKOV, B. (1964), Physiol. Rev., 44: 518.
- USHAKOV, B. (1967), en Molecular Mechanisms of Temperature Adaptation, pags. 107-129, (ed. C.L. PROSSER), Amer. Assoc. Advan. Sci., Washington, D.C.
- UTTER, F.M. y HODGINS, H.O. (1969), J. Exp. Zool.,
172: 59.
- VALDIVIESSCO, D.; CONDE, E. y TAMSITT, J.R. (1968),
Comp. Biochem. Physiol., 27: 133.
- VALKIRS, A. (1978), Comp. Biochem. Physiol., 59A: 31.
- VAN DEENEN, L.L.M. (1969), en The Molecular Basis of Membrane Function, pags. 47-78, (ed. D.C. TOSTESSON), Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall.
- VESELL, E.S. (1975), en Isozymes II: Physiological function, pags. 1-28, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- VESELL, E.S. y BEARN, A.G. (1957), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94: 96.
- VRIJENHOEK, R.C. (1972), Amer. Nat., 106: 754.
- WACHSMUTH, E.D.; PFLEIDERER, G. y WIELAND, T. (1964),
Biochem. Z., 340: 80.
- WHITT, G.S. (1969), Science, 166: 1156.
- WHITT, G.S. (1970), J. Exp. Zool., 175: 1.
- WHITT, G.S. y BOOTH, G.M. (1970), J. Exp. Zool.,
174: 215.
- WHITT, G.S.; CHILDERS, W.F. y WHEAT, T.E. (1971),
Biochem. Genet., 5: 257.
- WHITT, G.S. y HOROWITZ, J.J. (1970), Experientia,
26: 1302.

- WIELAND, T. y PFLEIDERER, G. (1957), Biochem. Z., 329: 112.
- WIELAND, T.; PFLEIDERER, G.; HAUPT, I. y WÖRNER, W. (1959), Biochem. Z., 332: 1.
- WIEME, R.J. y VAN MAERCKE, Y. (1961), Ann. N.Y. Acad. Sci., 94: 898.
- WILSON, F.R. (1973), Ph. D. Thesis, University of Illinois.
- WILSON, T.L. (1977), Arch. Biochem. Biophys., 179: 378.
- WILSON, A.C.; CAHN, R.D. y KAPLAN, N.O. (1963), Nature, 197: 331.
- WILSON, F.R.; CHAMPION, M.J.; WHITT, G.S. y PROSSER, C.L. (1975), en Isozymes II: Physiological function, pags. 193-206, (ed. C.L. MARKERT), Academic Press, Nueva York.
- WILSON, A.C.; KAPLAN, N.O.; LEVINE, L.; PESCE, A.; REICHLIN, M. y ALLISON, W.S. (1964), Fed. Proc., 23: 1258.
- WILSON, F.R.; WHITT, G.S. y PROSSER, C.L. (1973), Comp. Biochem. Physiol., 46B: 105.
- WOLF, U. y ENGEL, W. (1972), Humangenetik, 15: 99.
- WRIGHT, P.A. (1956), Anat. Rec., 125: 585.
- WRIGHT, P.A. (1959), Endocrinology, 64: 551.
- WRIGHT, P.A.; JORDAN, E.J. y HAIGHT, A.S. (1958), Endocrinology, 62: 696.
- WRIGHT, D.A. y MOYER, F. (1968), J. Exp. Zool., 167: 197.
- ZINKHAM, W.H. (1968), Ann. N.Y. Acad. Sci., 151: 598.
- ZINKHAM, W.H.; BLANCO, A. y CLOWRY, L.J. (1964), Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 571.
- ZINKHAM, W.H.; BLANCO, A. y KUPCHYK, L. (1963), Science, 142: 1303.

ZINKHAM, W.H.; INENSEE, H. y RENWICK, J.H. (1969),
Science, 164: 185.

ZINKHAM, W.H.; KUPCHYK, L.; BLANCO, A. e INENSEE, H.
(1966), J. Exp. Zool., 162: 45.